Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

48. BAND, 5. HEFT

MIT 48 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 6. MÄRZ 1957)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957

Planta (Berl.)

Preis DM 22.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Inst. der Universität.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 2791

---

48. Band **Inhaltsverzeichnis** 5. Heft

Greb, H., Der Einfluß tiefer Temperatur auf die Wasser- und Stickstoffaufnahme der Pflanzen und ihre Bedeutung für das „Xeromorphieproblem". Mit 7 Textabbildungen 523

Thielke, Ch., Über Differenzierungsvorgänge bei Cyperaceen. I. Der Bau des vegetativen Vegetationskegels und die Anfangsstadien der Blattentwicklung. Mit 10 Textabbildungen 564

Eschrich, W., Kallosebildung in plasmolysierten Allium cepa-Epidermen. (II. Mitteilung über Kallose.) Mit 8 Textabbildungen 578

Paech †, K., Carotinbildung und Stickstoffumsatz. Mit 1 Textabbildung . 587

Hager, A., Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe. Mit 20 Textabbildungen 592

Kaul, R., Ein Schnellverfahren zur quantitativen Bestimmung der Peroxydaseaktivität in Pflanzenpreß-Säften. Mit 2 Textabbildungen 622

Brucker, W., Zur Biogenese der Gallus- und Protocatechusäure durch Phycomyces blakesleeanus. (Kurze Mitteilung.) 627

Planta, Bd. 48, S. 523—563 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Stuttgart-Hohenheim (Direktor: Prof. Dr. H. Walter)

DER EINFLUSS TIEFER TEMPERATUR AUF DIE WASSER- UND STICKSTOFFAUFNAHME DER PFLANZEN UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DAS „XEROMORPHIEPROBLEM"

Von

Helmut Greb

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. September 1956)

I. Einleitung

Der Begriff der Xeromorphie wurde ursprünglich für die strukturellen Veränderungen der Pflanzen eingeführt, die durch Trockenheit des Substrats hervorgerufen werden. Bald stellte man jedoch fest, daß auch auf gewissen feuchten Standorten Xeromorphosen auftreten, z. B. auf den extrem nassen Hochmooren. Daraus schloß man, daß auch Hochmoorpflanzen unter Wassermangel leiden. So kam es, daß Schimper 1898 den Begriff der „physiologischen Trockenheit" einführte. Die Kritik, die Schimper von zeitgenössischen Autoren erfuhr, richtete sich nicht gegen dieses Prinzip, sondern nur gegen die von ihm angenommene Ursache dieser Erscheinung, vor allem gegen seine Hypothese der Humussäurewirkung bei Hochmooren. Besonders war es hier die erstmals von Kihlmann (1890) vertretene Annahme einer Kältewirkung, die in der Folgezeit von zahlreichen Forschern unterstützt wurde (nähere Literatur s. Montfort 1918). Stark beachtet wurden auch die Untersuchungen von Dachnowsky (1908), der Sumpftoxine („bog-toxins") als Ursache annahm. Doch erst Montfort wies 1918 an Hand von vergleichenden Untersuchungen der Hochmoorflora auf die Unhaltbarkeit der Hypothese einer „physiologischen Trockenheit" der Hochmoore hin und lieferte dann auch 1921 und 1922 den Beweis, daß im Hochmoor die Wasseraufnahme der Hochmoorpflanzen nicht gehemmt ist. Dadurch war die Schimpersche Hypothese für die Moorstandorte widerlegt. Eine weitere Klärung brachte die Feststellung von Firbas (1931), daß die im nassen, wachsenden Hochmoor stehenden, stark xeromorph gebauten Pflanzen einen niedrigeren osmotischen Wert aufweisen als die auf trokkeneren, verheideten Standorten wachsenden weniger xeromorphen Exemplare. Der osmotische Wert folgte also den Feuchtigkeitsverhältnissen des Standorts, wie es nach Walter (1931) zu erwarten war. Ein ähnliches Verhalten konnte Walter (1931) auch bei in tiefem Schatten wachsenden Kümmerpflanzen beobachten, die trotz gewisser „xeromorpher"

Baumerkmale im Vergleich zu Normalpflanzen niedrigere osmotische Werte aufwiesen, so daß auch hier die sonst allgemein bestehende positive Korrelation zwischen xeromorphen Strukturen und osmotischem Wert durchbrochen war. Damit stand fest, daß das Auftreten der Xeromorphie nicht kausal mit Wassermangel verknüpft zu sein braucht.

Ein Jahr später veröffentlichte dann MOTHES seine Versuche mit typischen Mesophyten, wie *Nicotiana rustica*, *Zea mays*, *Coleus*-Varietäten und *Tradescantia*, bei denen er feststellte, daß durch Nitratmangel typische Xeromorphie hervorgerufen wird. Er äußerte hierbei die Ansicht, daß wohl auch die Xeromorphie der Hochmoorpflanzen mindestens zum Teil durch Stickstoffmangel bedingt sei und wies dabei besonders auf den ausgesprochen hygromorphen Bau von *Drosera* hin, die als Insektivore zusätzlich Stickstoff erhält. Vermutungen über einen Zusammenhang zwischen Xeromorphie und Nährstoffarmut wurden ja schon wesentlich früher aufgestellt, zuerst wohl von NILSSON (1898), doch fehlte bislang der experimentelle Nachweis dafür. Bezüglich der Ursache der Xeromorphie der Hochmoorpflanzen wurde die MOTHESsche Theorie von MARTHALER (1939) zunächst nicht bestätigt, doch wies dann MÜLLER-STOLL (1947) durch quantitativ-anatomische Untersuchungen nach, daß durch Stickstoffdüngung die Xeromorphie der Hochmoorpflanzen deutlich herabgesetzt wird, die Ansicht MARTHALERs also voreilig war. Dieses Ergebnis der MÜLLER-STOLLschen Untersuchungen wurde 1948 von SIMONIS durch Versuche mit *Andromeda polifolia* voll bestätigt.

Wenig später untersuchte der in Sibirien arbeitende Russe DADYKIN (1950a) die Ursache der Xeromorphie bei arktischen Pflanzen. Er prüfte zuerst, was ja am nächsten lag, den Wasserhaushalt, stellte jedoch fest, daß bei arktischen Pflanzen die Transpiration bei tiefer Temperatur nicht gehemmt ist, wobei er allerdings im Gegensatz zu STOCKER (1932) steht, aber im Einklang mit GRIGORJEVA (1953). Es war nun sehr wahrscheinlich, daß der wirksame Faktor auf dem Gebiet der Nährsalzversorgung zu suchen war. Um dies zu ermitteln, verwendete DADYKIN 10—12 Tage alte Gerste- und Haferkeimlinge und teilte bei jeder Pflanze das Wurzelsystem in zwei gleiche Hälften. Von diesen tauchte er die eine in eine Nährlösung, die mit Eis gekühlt wurde (+ 1 bis + 2° C), die andere in eine solche von + 15 bis + 25° C. Er probierte nun sämtliche Verteilungsmöglichkeiten der drei wichtigsten Nährsalze, nämlich Stickstoff, Kali und Phosphor, aus und stellte fest, daß die Pflanzen immer dann wesentlich kleiner blieben, wenn der Stickstoff im kalten Gefäß geboten wurde. Er schloß daraus, daß die Xeromorphie der Pflanzen auf kalten Böden auf der gehemmten Stickstoffaufnahme beruht.

Dies war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Zunächst mußte die DADYKINsche Annahme durch quantitative Stickstoffanalysen geprüft und die Pflanzen auf ihren Xeromorphiegrad untersucht

werden, wobei neben einer Monokotylen auch eine Dikotyle verwendet werden sollte. Dann war es notwendig nachzuprüfen, ob eine eventuelle Hemmung der Stickstoffaufnahme nur eine Folge einer durch tiefe Temperatur gehemmten Wurzelentwicklung und damit einer eventuellen Hemmung der Wasseraufnahme ist oder ob sie unabhängig von diesen Faktoren ist, bzw. in welcher Beziehung sie zu diesen steht. Dabei zeigte sich (1954), daß diese Beziehungen stark von dem Stickstoffgehalt des Substrats abhängig sind. Deshalb wurde in den Jahren 1955 und 1956 dieser ganze Faktorenkomplex mit 2 verschiedenen Stickstoffkonzentrationen (einfache und doppelte Stickstoffmenge) untersucht.

II. Methodik

1. Das Gerät

Die von DADYKIN angegebene Methodik wurde im Prinzip beibehalten, im einzelnen jedoch sehr stark verändert und verbessert. Für die Versuche mit geteiltem Wurzelsystem verwendeten wir als Nährlösungsbehälter je 2 große Reagensgläser (30/200 mm, rd. 110 cm^3 Inhalt), von denen das eine in ein ca. 45° gegen die Horizontale geneigtes, mit Eis gefülltes Dewargefäß gehängt wurde, das andere unter fast gleichem Winkel frei nach außen abging (Abb. 1). Durch eine enganliegende schwarze Papierhülle zur Abhaltung des diffusen Lichtes und eine weite weiße Hülle zur weitgehenden Reflexion der direkten Sonnenstrahlen wurde bewirkt, daß die Temperatur der Nährlösung in diesem Reagensglas fast genau der Lufttemperatur folgte (Abweichung normalerweise nicht größer als 2° C). Im gekühlten Gefäß stieg die Temperatur von einer Eisfüllung zur anderen von 0° auf 1—2° C. Bei sehr starker Einstrahlung konnte die oberste Nährlösungsschicht vorübergehend bis auf 3° C erwärmt werden. Außer in diesem Extremfalle bestand ein Temperaturgefälle innerhalb der Nährlösung praktisch nicht. Eis wurde normalerweise alle 2 Tage, bei sehr warmem Wetter alle Tage nachgefüllt.

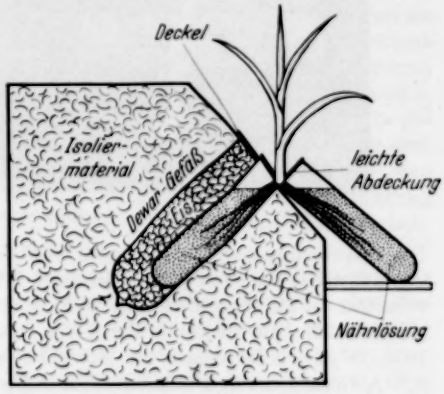


Abb. 1. Versuchsanordnung bei Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem

Je 12 Dewargefäße wurden in einen mit Isoliermaterial (Papier und Glaswolle) gefüllten Holzkasten in 3 Reihen übereinander so montiert, daß sich die Pflanzen gegenseitig möglichst wenig beschatteten (Abb. 2). Die Dewargefäße wurden mit einer Hartfaserplatte nach außen abgeschlossen und diese mit einem Wollfilz und einem weißen Papier (Reflektor) bedeckt. Die mit Nährlösung gefüllten Reagensgläser dichteten wir mit gewaschener Rohwolle (saugt kein Wasser an) ab. Die Verdunstung durch diesen Rohwollpfropfen war praktisch gleich Null.

Bei den Versuchen mit ungeteiltem Wurzelsystem wurden die Kästen für die kalt gehaltenen Pflanzen verwendet, für die warm gehaltenen stellten wir gleich große Glasrohre in einfache Holzkisten.

2. Die Nährlösungen und ihre Verteilung

Da die Themastellung eine möglichst saubere Isolierung des Stickstoffaktors erfordert, wurde die DADYKINsche Versuchsanordnung mit geteiltem Wurzelsystem für die meisten Versuche beibehalten. DADYKIN hatte durch seine Nährlösungsverteilung den Wasserfaktor zwar weitgehend ausgeschaltet, in bezug auf die Nährsalze wirkte aber stets ein ganzer Faktorenkomplex auf die Pflanze ein. Wir gingen deshalb so vor, daß wir der einen Wurzelhälfte die vollständige Nährlösung (nach VON DER CRONE) boten, der andern die entsprechende Stickstoffmangellösung (nach V. D. CRONE-MERKENSCHLAGER, s. SCHROPP 1951), wobei jeweils bei 2 Parallelpflanzen entweder die eine oder die andere Nährlösung gekühlt wurde.

Abb. 2. Versuchskästen: Links ohne Pflanzen, rechts mit Haferpflanzen

Die Nährlösung nach V. D. CRONE wurde deshalb verwendet, weil sie sich in Vorversuchen als besser erwies als die nach KNOP. Da die Stickstoffmangellösung nach V. D. CRONE-MERKENSCHLAGER jedoch mehr Kalium in Form von KCl enthält als die nach V. D. CRONE in Form von KNO_3, wurden für die Versuche der Periode 1955/56 der KCl-Gehalt der Stickstoffmangellösung so reduziert, daß er dem KNO_3-Gehalt der V. D. CRONEschen Nährlösung äquivalent war. Dadurch wurde also auf der kalten und warmen Seite des Geräts, abgesehen vom Stickstoffaktor, eine möglichst weitgehende Gleichheit des Substrats erreicht. Wir müssen uns aber stets vor Augen halten, daß hierbei der Pflanze insgesamt, d. h. beide Gefäße zusammengerechnet, im Vergleich mit den andern Nährsalzen nur die halbe Stickstoffmenge geboten wurde. Deshalb wurde zunächst einmal (1954) auf der einen Seite der N-Gehalt der Nährlösung durch Zusatz einer äquivalenten $Ca(NO_3)_2$-Menge auf die doppelte Höhe gebracht. Es zeigte sich aber, daß sich hierbei die Verhältnisse bei der Stickstoffaufnahme wesentlich änderten. Die Frage für die Jahre 1955/56 war also: Ist diese Erscheinung durch die erhöhte Calciumgabe[1] oder durch das größere Stickstoffangebot bedingt? Zur Klärung dieses Problems wurden 4 Parallelen angesetzt: 1. mit normal-v. d. Crone, 2. mit v. d. Crone + einer dem $Ca(NO_3)_2$ äquivalenten $CaCl_2$-Menge, 3. mit v. d. Crone + einer dem $Ca(NO_3)_2$ äquivalenten KNO_3-Menge und 4. mit v. d. Crone + $Ca(NO_3)_2$. Allen Nährlösungen, auch der N-Mangellösung, wurde noch AZ-Lösung nach HOAGLAND zugegeben.

Zur Klärung des Problems und zur Untersuchung der Bedeutung des Wasserfaktors führten wir noch die gleichen Versuche mit ungeteiltem Wurzelsystem, d. h. ohne Stickstoff-Mangellösung, durch.

[1] BURSTRÖM (1954) fand, daß Calcium die Stickstoffaufnahme fördert.

In den Tabellen und Abbildungen werden für die Nährlösungen folgende kurze Bezeichnungen verwendet:

für N-Mangellösung:	0 (Null)
für N-haltige Nährlösung allgemein:	N
für normale v. d. Crone-Nährlösung:	1 N
für v. d. Crone-Nährlösung + $CaCl_2$:	1 N + Ca
für v. d. Crone-Nährlösung + KNO_3:	2 N + K
für v. d. Crone-Nährlösung + $Ca(NO_3)_2$:	2 N + Ca

Diese Bezeichnungen erhalten dann evtl. noch den Zusatz „warm" oder „kalt".

Während des Versuchs wurde die Nährlösung nur dann völlig durch frische Nährlösung ersetzt, wenn eine stärkere Verarmung an Stickstoff eintrat. Sonst wurde nur so viel neue Nährlösung nachgefüllt, wie die Pflanze verbraucht hatte. Eine Belüftung der Nährlösungen fand nicht statt.

3. *Die Pflanzen und ihre Anzucht*

Zunächst wurden Hafer, Mais, Buchweizen, Raps und Buschbohne auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Mais ertrug das Einsetzen in das Gerät sehr schlecht. Ein großer Teil der Pflanzen ging dabei ein. Buchweizen wuchs viel zu langsam. Raps erwies sich wegen seiner stark behaarten Blätter für Stomata-Messungen als ungünstig. Nur Hafer (Sorte: Heines Silber II, Saatgut des Saatzuchtinstituts Hohenheim) und Buschbohne (Sorte: 1954: Gelbe englische Treibbuschbohne, Saatgut des Botanischen Gartens Hohenheim, 1955: Wagners Regula, Hochzucht, Saatgut der Großgärtnerei W. Pfitzer, Stuttgart-Fellbach) erwiesen sich als geeignet. Mit diesen beiden Pflanzenarten umfaßt man ja ziemliche Extreme: die eine ist eine gegen Kälte weitgehend unempfindliche Monokotyle, die andere eine kälteempfindliche Dikotyle. Sollte sich nun im Laufe der Versuchsdurchführung bei beiden Pflanzenarten dasselbe Phänomen zeigen, so wäre es sehr wahrscheinlich, daß dieses Ergebnis allgemeine Gültigkeit besitzt.

Anzucht der Pflanzen. Bei Gramineen macht die Teilung des Wurzelsystems wegen ihrer homorrhizen Bewurzelung keine Schwierigkeiten. Man teilt eben das sich von selbst darbietende Wurzelbüschel nach bestem Wissen in zwei gleiche Hälften. Bei Dikotylen jedoch ist die Wurzelteilung wesentlich komplizierter, denn man ist hier gezwungen, Nebenwurzeln in größerer Anzahl heranzuziehen. Wir gingen hierbei so vor: Möglichst gleichmäßiges Saatgut von Bohnen ließ man 6 Tage in feuchter Watte quellen und keimen; dann kappte man die Wurzelspitze (Anregung zur Seitenwurzelbildung) und setzte die Keimlinge in Reagensgläser mit v. d. Crone-Nährlösung. Zwei Tage später schnitt man die Hauptwurzel bis auf die Ansatzstellen der obersten Seitenwurzeln vollends ab. Weitere 6 Tage (1954) bzw. 8 Tage (1955/56) später wurden dann die jungen Pflanzen ins Gerät gesetzt. Für Hafer sind die Anzuchtdaten folgende: Ausgesucht gleichmäßiges Saatgut wurde 24 Stunden lang in Leitungswasser gequollen und anschließend auf schräggestelltem feuchtem Filtrierpapier in Küvetten zum Keimen ausgelegt. Nach ca. 5 Tagen pflanzten wir die jungen Keimlinge in Reagensgläser mit v. d. Crone-Nährlösung um und setzten sie 14 Tage (1954) bzw. 16 Tage (1955/56) nach dem Auslegen in das Gerät.

Beim Einsetzen in das Gerät wurden von den vorhandenen Keimlingen (die Anzucht betrug stets das 12fache der erforderlichen Menge) jeweils möglichst gleiche zu Zweiergruppen zusammengefaßt. Von jeder Gruppe wurde der einen Pflanze der Stickstoff im warmen Gefäß, der anderen der Stickstoff im kalten Gefäß geboten. Die Parallelpflanzen hatten also das Substrat Stickstoff-warm und stickstofffrei-kalt bzw. stickstofffrei-warm und Stickstoff-kalt. Bei Hafer war der Unterschied innerhalb der Gruppe wie auch zwischen den Gruppen meist gering.

Die gelbe englische Treibbuschbohne entwickelte sich jedoch auch aus weitgehend gleichmäßigem Saatgut sehr ungleichmäßig. Dies machte sich oft bei der Auswertung der Ergebnisse unangenehm bemerkbar. Wagners Regula dagegen lieferte ein viel einheitlicheres Anzuchtmaterial, mußte jedoch vor dem Auslegen gegen *Colletotrichum* gebeizt werden (30 min. mit 0,1%iger Ceresan-Naßbeize).

Diese Ausführungen über die Anzucht der Pflanzen gelten auch für die Versuche mit ungeteiltem Wurzelsystem, nur wurde hierbei bei Bohne die Hauptwurzel nicht entfernt.

4. Methodik der Stickstoffanalyse

Die Stickstoffaufnahme bestimmten wir als Differenz zwischen der in der Nährlösung gebotenen Stickstoffmenge und der am Schluß des Versuchs noch vorhandenen Stickstoffmenge. Die quantitative Nitratanalyse am Schluß des Versuchs erfolgte colorimetrisch nach der Diphenylaminmethode von PFEILSTICKER (1932). Für jede Pflanze wurden 4 parallele Analysen zu je 6 Ablesungen durchgeführt und aus den Ergebnissen das Mittel gezogen. Kontrollversuche ergaben, daß hierbei infolge kleiner Verdünnungsverschiedenheiten, Ablesefehler usw. im Jahre 1954 mit einem Fehler bis zu $\pm 3\%$ gerechnet werden mußte. 1955 und 1956 gelang es durch Verbesserung der Methodik, diesen Fehler auf unter $\pm 1\%$ zu senken. Da dieser Fehler immer gleich bleibt, wird der Wert der Stickstoffaufnahme um so genauer, je größer die Stickstoffaufnahme ist. Die angegebenen Werte beziehen sich auf N, nicht auf NO_3^-.

5. Methodik der anatomischen Blattuntersuchung

Wenn man vergleichende anatomische Untersuchungen durchführen will, muß man sich auf eine bestimmte Stelle der Probenentnahme festlegen, denn es ist ja schon lange bekannt, daß die anatomische Struktur selbst innerhalb eines einzelnen Blattes nicht immer die gleiche ist. Die Wahl dieser Probefläche ist jedoch weitgehend willkürlich, sofern es sich dabei um ein anatomisch möglichst einheitliches und in seiner Lage genau festlegbares Blattstück handelt. Wir verwendeten für unsere Versuche bei Hafer die Mitte der Blattunterseite, bei Bohne diente dazu ein Stück aus dem Winkel zwischen dem Mittelnerv und dem ersten, von unten gesehen rechten Seitennerv 1. Ordnung des mittleren Fiederblatts. Bei jedem Blatt wurden 10 Messungen der Stomata- und Nervaturdichte vorgenommen. Bei Hafer ist es jedoch nicht sinnvoll, die Nervaturdichte anzugeben, da bereits durch einen früher oder später auskeilenden Blattnerv Schwankungen von 6—8% auftreten.

III. Kurze Beschreibung der Versuche

Als im Winter 1953/54 mit der Prüfung verschiedener Pflanzen auf ihre Eignung begonnen wurde, zeigte sich sehr bald, daß die Entwicklung des Wurzelsystems durch tiefe Temperatur stets stark gehemmt wird. Ein schwächer entwickeltes Wurzelsystem bedeutet aber eine kleinere wasser- und stickstoffaufnehmende Oberfläche. Es tauchte daher die Frage auf: Wurde der von DADYKIN festgestellte geringere Massenzuwachs bei Stickstoff im kalten Gefäß nicht vielleicht durch die Folgen einer gehemmten Wurzelentwicklung bedingt? Die Versuche des Jahres 1954 dienten der Klärung dieses Problems. Zunächst mußte eine Methode gefunden werden, durch die man auf der warmen und kalten Seite ein gleichmäßig entwickeltes Wurzelsystem erhält. Dieses

sollte theoretisch erreicht werden, indem man die den Wurzelhälften gebotenen Nährlösungen alle 3 Tage austauscht, d. h. den warmen Wurzelteil ins kalte und den kalten Wurzelteil ins warme Gefäß bringt. Da jedoch die Teilung des Wurzelsystems am Anfang des Versuchs nur nach Augenmaß vorgenommen wurde (s. Kap. II/3), kam es trotz Beachtung sämtlicher Vorsichtsmaßregeln zu einer auf beiden Seiten etwas verschiedenen Wurzelentwicklung. Praktisch ist dies jedoch ohne Bedeutung, denn durch den periodischen Austausch der Nährlösungen heben sich ja im Endeffekt alle Verschiedenheiten des Wurzelsystems auf. Der erste größere Versuch wurde vom 25. II. bis 18. III. 1954 mit der raschwüchsigen Bohne durchgeführt. Das an einem Südfenster bei 18—20° C Zimmertemperatur stehende Gerät enthielt 6 Pflanzen mit einfacher Stickstoffmenge im warmen und 6 mit einfacher Stickstoffmenge im kalten Gefäß. Bei drei Zweiergruppen wurden die Nährlösungen alle 3 Tage ausgetauscht, bei den restlichen drei blieben die Wurzelhälften dauernd im gleichen Gefäß. Anschließend wurden dieselben Versuche mit Hafer durchgeführt und zwar vom 11. III. bis 4. IV. bzw. 22. III. bis 15. IV. 1954 mit je 2 Parallelen, also mit zusammen 16 Pflanzen. Die Unterschiede der Ergebnisse beider Versuchsteile waren so gering, daß sie zu einem Versuch zusammengefaßt werden konnten. Wegen der fortgeschrittenen Jahreszeit und der Kälteresistenz des Hafers wurden diese Untersuchungen im Kalthaus durchgeführt. Anfangs traten öfters Nachtfröste ein, um die Mittagszeit stiegen jedoch die Temperaturen trotz Belüftung manchmal bis auf 35° C an. Alle diese Versuche zeigten, daß sich Pflanzen mit ausgetauschten und nicht ausgetauschten Nährlösungen prinzipiell gleich verhielten, so daß in den Jahren 1955 und 1956 auf die Anordnung mit periodischem Austausch der Nährlösungen verzichtet werden konnte.

Im Jahre 1954 haben wir also unsere Versuche so durchgeführt, daß wir der Pflanze auf der einen Seite normale v. d. Crone-Nährlösung und auf der anderen Seite Stickstoffmangellösung boten. Die Pflanze hatte daher, verglichen mit den anderen Nährsalzen, nur die halbe Stickstoffmenge zur Verfügung. Die Frage war nun: Was geschieht, wenn der Stickstoffgehalt der einen Seite verdoppelt wird? Da aber ein Anion nicht ohne ein Kation geboten werden kann, mußten wir mit 4 verschiedenen Nährlösungen arbeiten. Sie wurden schon im Kapitel II/2 auf S. 526 eingehend beschrieben. Der Haferversuch wurde vom 1. bis 25. VIII. 1955 unter einem Glasdach durchgeführt. Das Monatsmittel betrug 16,6°. An 6 Tagen stieg die Temperatur über 25°. Wir arbeiteten hierbei wie normal mit je 3 Parallelen (zusammen 24 Pflanzen). Der entsprechende Bohnenversuch dauerte vom 1.—26. IX. 1955. Das Gerät war in den ersten 2 Wochen wie beim vorhergehenden Versuch aufgestellt. Am 14. IX. brachte jedoch ein Vorstoß polarer Kaltluft ein

starkes Absinken der Temperaturen, so daß am 15. IX. ins Warmhaus umgezogen werden mußte (Maximum 25—30°, Minimum 13—17°). Beide Versuche zeigten, daß eine Erhöhung des Stickstoffgehalts im kalten Gefäß sich außerordentlich günstig auf die dortige Stickstoffaufnahme auswirkt, was sich auch äußerlich in einem besseren Wachstum zeigte. Weil diese Ergebnisse aber nur mit geteiltem Wurzelsystem erzielt wurden, unter Verhältnissen also, die in der Natur niemals auftreten, interessierte uns sehr stark die Frage: Was geschieht, wenn wir die Stickstoffmangellösung weglassen, d. h. was geschieht bei ungeteiltem Wurzelsystem? Mit dieser Anordnung führten wir vom 5.—27. X. 1955 einen Bohnenversuch und vom 30. I. bis 20. II. 1956 einen Versuch mit Hafer durch. Das Gerät wurde im Warmhaus aufgestellt (Maximum 20—26°, Minimum 12—16°). Die Haferpflanzen beleuchteten wir nachts zur Erzielung eines besseren Wachstums mit 1 Osram HNT 200 40 W R wpx-Leuchtstoffröhre pro Quadratmeter.

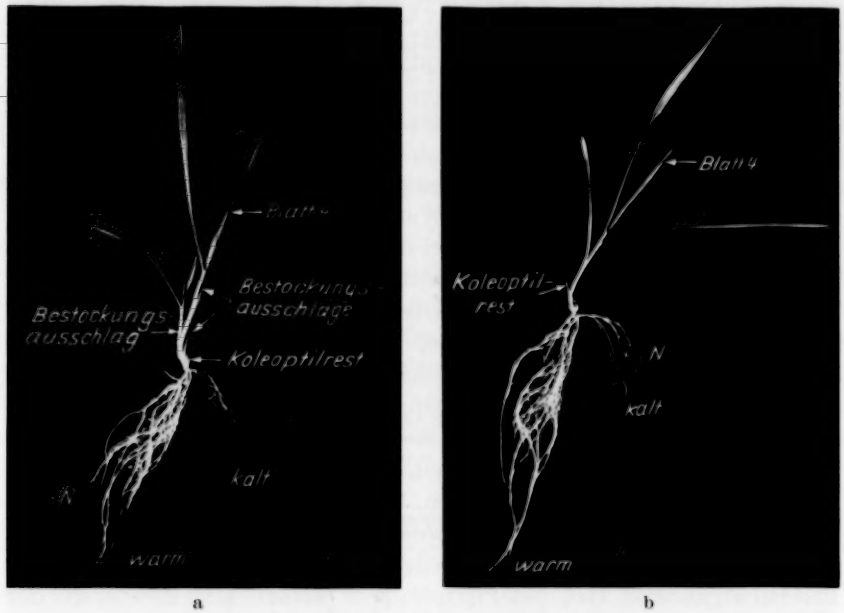
Außer den hier beschriebenen Versuchen kamen noch folgende zur Ausführung: 1 Haferversuch mit geteiltem Wurzelsystem, einfacher und doppelter Stickstoffmenge vom 7.—28. X. 1955; 1 Haferversuch mit ungeteiltem Wurzelsystem, einfacher und doppelter Stickstoffmenge vom 23. I. bis 13. II. 1956; 1 Bohnenversuch mit geteiltem Wurzelsystem, einfacher Stickstoffmenge, ausgetauschter und nicht ausgetauschter Nährlösung vom 7.—28. V. 1954; 3 Bohnenversuche mit geteiltem Wurzelsystem, einfacher und doppelter Stickstoffmenge vom 10.—31. V. 1954, 30. VI. bis 28. VII. 1955 und 14. XI. bis 5. XII. 1955; 1 Bohnenversuch mit ungeteiltem Wurzelsystem, einfacher und doppelter Stickstoffmenge vom 14. XI. bis 5. XII. 1955.

Diese Versuche bestätigten die hier veröffentlichten Ergebnisse. Auf Unterschiede wird im Text eingegangen. Das gesamte Material ist im Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Stuttgart-Hohenheim hinterlegt und kann dort eingesehen werden.

IV. Der Einfluß tiefer Temperatur auf die Entwicklung des Wurzelsystems

Bevor wir uns der Wasseraufnahme zuwenden, müssen wir zuerst die Veränderungen betrachten, die das Wurzelsystem in seiner Entwicklung und Ausbildung durch tiefe Temperatur erleidet. Es zeigt sich, daß tiefe Temperatur die Wurzelentwicklung sowohl bei Hafer als auch bei Bohnen stark hemmt. Vor allem die Seitenwurzelbildung wird extrem verlangsamt. Dies sieht man deutlich auf Abb. 3: Auf der warm gehaltenen Seite einen dichten Wurzelfilz, auf der kalt gehaltenen einige fadenförmige unverzweigte Wurzeln. Diese Erscheinung ist schon längere Zeit bekannt (DADYKIN 1950b, MOROZOV 1950, GRIGORJEVA 1953 u. a.). Bei Hafer ist die Hälfte des Wurzelsystems in stickstoffhaltiger warmer Nährlösung stets kürzer, aber dichter als die in stickstofffreier warmer

Nährlösung (s. Abb. 3). Auch bei Bohnen ist das Wurzelsystem der stickstoffhaltigen warmen Seite meist etwas dichter, doch tritt hier diese Erscheinung nicht so deutlich hervor. Die Bohnenwurzeln stellen auf der kalt gehaltenen Seite ihr Wachstum fast völlig ein (über Vitalitätsschädigungen s. Kap. VII). Bei Hafer dagegen geht das Längenwachstum und die Bildung neuer sproßbürtiger Wurzeln zwar langsam, aber doch deutlich meßbar weiter. Gegenüber dieser extremen Hem-



a b

Abb. 3a u. b. Das geteilte Wurzelsystem des Hafers nach 3wöchiger einseitiger Kühlung (Versuch 1954). a Stickstoff im warmen, b Stickstoff im kalten Gefäß

mung, die bei Hafer auf der kalten Seite nach 3—4 Wochen zu einer bis 15mal, bei Bohnen sogar bis über 30mal schwächeren Entwicklung der Wurzeln als auf der warmen Seite führt, sind alle andern Veränderungen nur noch verhältnismäßig schwach. So zeigt sich (abgesehen vom Bohnenversuch 1954, s. Tabelle 1), daß *in stickstoffhaltiger Nährlösung*

Tabelle 1. *Geteiltes Wurzelsystem: Frischgewicht in Gramm*[1]

Nährlösung		Hafer 1954		Bohne 1954	
warm	kalt	warm + kalt = gesamt	$\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$	warm + kalt = gesamt	$\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$
1N	0	*0,97* + 0,07 = 1,04	13,9	*3,09* + 0,21 = 3,30	14,7
0	1N	0,93 + *0,10* = 1,03	9,3	2,74 + *0,15* = 2,89	18,3

[1] *Kursiv gedruckte* Zahlen bezeichnen hier, wie auch in den folgenden Tabellen, das Wurzelsystem in der stickstoffhaltigen Nährlösung.

Tabelle 2. *Geteiltes Wurzelsystem: Frischgewicht in Gramm*

Nährlösung warm	Nährlösung kalt	Hafer 1955 warm + kalt = gesamt	Hafer 1955 $\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$	Bohne 1955 warm + kalt = gesamt	Bohne 1955 $\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$
1 N	0	*1,70* + 0,16 = 1,86	10,6	*7,76* + 0,43 = 8,19	18,0
0	1 N	1,61 + *0,26* = 1,87	6,2	6,10 + *0,47* = 6,57	13,0
1 N + Ca	0	*1,63* + 0,14 = 1,77	11,6	*8,65* + 0,44 = 9,09	19,7
0	1 N + Ca	1,55 + *0,24* = 1,79	6,5	6,39 + *0,51* = 6,90	12,5
2 N + K	0	*2,00* + 0,17 = 2,17	11,8	*8,06* + 0,39 = 8,45	20,6
0	2 N + K	1,45 + *0,22* = 1,67	6,6	6,70 + *0,51* = 7,21	13,1
2 N + Ca	0	*1,57* + 0,14 = 1,71	11,2	*7,22* + 0,37 = 7,59	19,5
0	2 N + Ca	1,72 + *0,19* = 1,91	9,0	5,92 + *0,49* = 6,41	12,1

die Wurzelentwicklung gegenüber der stickstofffreien Seite stets *gefördert* ist (s. Tabelle 1 und 2, Quotient Wurzel warm : Wurzel kalt), eine Erscheinung, die wir später auch bei der Wasseraufnahme wiederfinden werden. Auch ist das Gesamtgewicht (warm + kalt) der Wurzel bei Bohne stets kleiner, wenn der Stickstoff im kalten Gefäß geboten wurde, als wenn er sich im warmen befand. Hafer ist seiner Natur nach gegen solche Einflüsse unempfindlicher. Schwankungen der Ergebnisse ließen sich nicht vermeiden. Sie sind abhängig vom Ausgangsmaterial.

Es bestand nun die Gefahr, daß die durch tiefe Temperatur gehemmte Wurzelentwicklung sich negativ auf die Wasser- und Stickstoffaufnahme auswirkt. Um dies zu untersuchen, führten wir noch Versuche durch, bei denen wir durch periodischen Austausch der Nährlösungen eine gleichmäßige Entwicklung beider Wurzelhälften erzielten (s. auch Kap. III). Hierbei ergab sich, daß bei Pflanzen mit periodischem Austausch der warmen und kalten Nährlösung gegenüber solchen ohne Austausch eine deutliche Hemmung des Wurzelwachstums eintrat (vgl. in Tabelle 3, Kol. 1 mit 2, bzw. 3 mit 4). Bei Bohnen war diese Differenz beträchtlich, bei Hafer schwächer. Dies deutet darauf hin, daß Hafer gegen die beim Umsetzen vom warmen ins kalte Gefäß bzw. umgekehrt auftretende Schockwirkung unempfindlicher ist als Bohnen. Diese Erscheinung ist von ganz allgemeiner Bedeutung. Wir werden auf sie auch bei der Behandlung der Wasser- und Stickstoffaufnahme stoßen.

Tabelle 3. *Geteiltes Wurzelsystem: Gesamt-Frischgewicht in Gramm*

Nährlösung warm	Nährlösung kalt	Hafer 1954 1 Nährlösungen nicht ausgetauscht	Hafer 1954 2 Nährlösungen periodisch ausgetauscht	Bohne 1954 3 Nährlösungen nicht ausgetauscht	Bohne 1954 4 Nährlösungen periodisch ausgetauscht
1 N	0	1,04	0,75	3,30	1,54
0	1 N	1,03	0,69	2,89	0,90

Ungeteilte Wurzelsysteme verhalten sich in bezug auf ihr Wachstum wie die entsprechenden Hälften der geteilten Wurzeln, deren Nährlösungen nicht ausgetauscht wurden (s. Tabelle 4).

Tabelle 4. *Ungeteiltes Wurzelsystem: Gesamt-Frischgewicht in Gramm*

Nährlösung	Temperatur	Hafer 1956	Bohne 1955	Nährlösung	Temperatur	Hafer 1956	Bohne 1956
1N	warm	2,12	3,81	2N + K	warm	2,14	3,39
	kalt	0,46	0,53		kalt	0,49	0,53
1N + Ca	warm	1,92	4,08	2N + Ca	warm	2,11	3,86
	kalt	0,42	0,52		kalt	0,47	0,52

Hier sollte die Entwicklung des Wurzelsystems nur so weit dargelegt werden, wie sie zum Verständnis der Wasser- und Stickstoffaufnahme nötig ist. Die Beziehung des Sprosses zur Wurzel u. ä. wird erst im Kapitel VIII behandelt.

V. Der Einfluß tiefer Temperatur auf die Wasseraufnahme

Bei Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem fällt zunächst einmal eine deutliche Hemmung der Wasseraufnahme auf der stickstofffreien warmen gegenüber der stickstoffhaltigen warmen Seite auf (s. Tabelle 5 und 6).

Tabelle 5. *Geteiltes Wurzelsystem: Wasseraufnahme in Kubikzentimeter*

Nährlösung		a) Nährlösungen nicht ausgetauscht		b) Nährlösungen periodisch ausgetauscht	
warm	kalt	warm + kalt = gesamt	$\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$	warm + kalt = gesamt	$\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$
		Hafer 1954			
1N	0	*41* + 20 = 61	2,05	*33* + 23 = 56	1,43
0	1N	24 + *25* = 49	0,96	23 + *32* = 55	0,72
		Bohne 1954			
1N	0	*226* + 103 = 329	2,20	*124* + 60 = 184	2,07
0	1N	128 + *111* = 239	1,15	78 + *83* = 161	0,94

Tabelle 6. *Geteiltes Wurzelsystem: Wasseraufnahme in Kubikzentimeter*

Nährlösung		Hafer 1955		Bohne 1955	
warm	kalt	warm + kalt = gesamt	$\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$	warm + kalt = gesamt	$\frac{\text{warm}}{\text{kalt}}$
1N	0	*98* + 71 = 169	1,38	*267* + 116 = 383	2,30
0	1N	78 + *59* = 137	1,32	139 + *89* = 228	1,56
1N + Ca	0	*89* + 72 = 161	1,24	*230* + 110 = 340	2,09
0	1N + Ca	76 + *54* = 130	1,41	122 + *85* = 207	1,44
2N + K	0	*102* + 67 = 169	1,52	*211* + 109 = 320	1,94
0	2N + K	71 + *79* = 150	0,90	163 + *118* = 281	1,38
2N + Ca	0	*89* + 72 = 161	1,24	*194* + 100 = 294	1,94
0	2N + Ca	79 + *69* = 148	1,14	162 + *102* = 264	1,59

Dies ist besonders gut aus den Tageskurven (s. Abb. 4 und 5)[1] gegen Ende der Versuche zu ersehen, wenn die Werte für den stickstoffhaltigen warmen Teil stark ansteigen. Die entsprechenden kalt-Werte verhielten sich nicht einheitlich. Im Jahre 1954 war die Wasseraufnahme aus stickstoffhaltiger kalter Nährlösung stets größer als die aus stickstofffreier kalter Nährlösung, 1955 dagegen geringer[2]. Dieses Absinken der Werte war aber nicht so stark wie die Depression der Wasseraufnahme bei der entsprechenden warm gehaltenen Wurzelhälfte. *Stickstoff im Substrat wirkte sich also stets günstig auf die Wasseraufnahme aus* (s. in Tabelle 5 und 6, Quotient Wasseraufnahme warm : Wasseraufnahme kalt). Diese Verschiebung kann so stark sein, daß Stickstoff-kalt-Pflanzen aus dem kalten Gefäß in manchen Fällen sogar mehr Wasser aufnehmen als aus dem warmen (s. z. B. in Tabelle 5, Hafer 1954, Spalte a und b, und Bohne 1954, Spalte b, aber auch sonst bei einzelnen Parallelen). Die Tatsache dieser Umkehrung ist besonders bei Stickstoff-kalt-Pflanzen ohne periodischen Nährlösungsaustausch erstaunlich, denn hier war

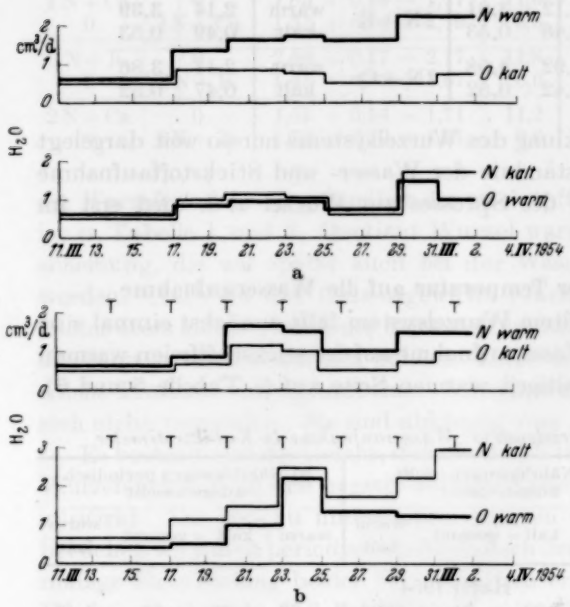


Abb. 4 a u. b. Geteiltes Wurzelsystem: Kurven der Wasseraufnahme pro Tag, Hafer 1954. a Nährlösungen nicht ausgetauscht; b Nährlösungen periodisch ausgetauscht

[1] Die Kurven N-warm bzw. N-kalt sind die Durchschnittswerte der täglichen Wasseraufnahme aus sämtlichen warmen bzw. kalten stickstoffhaltigen Nährlösungen des betr. Versuchs.

Der Wert für den letzten Tag wurde bei allen Kurven nicht angegeben, da er wegen des im warmen Gefäß gewachsenen Wurzelteils meist zu hoch wäre. Wenn sich in der Wasseraufnahmekurve zwei senkrechte Striche (warm und kalt) überschneiden würden, wurde der besseren Übersicht halber ein Strich seitlich versetzt. Diese seitliche Verschiebung bedeutet also nicht eine zeitliche Verschiebung der Ablesung.

Für die Wasseraufnahmekurve des Hafers 1954 wurde nur der erste Versuchsteil verwendet. Der zweite verhielt sich im Prinzip gleich, nur war dort die Gesamt-Wasseraufnahme bei N-kalt ausgetauscht geringer als bei N-warm ausgetauscht.

[2] Die Außentemperatur war 1954 während der Versuche tiefer als 1955 (siehe Kap. III).

ja der kalt gehaltene Wurzelteil am Schluß des Versuchs durchschnittlich nur $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$ so schwer wie der warm gehaltene und dazu noch im Gegensatz zum warm gehaltenen fast unverzweigt (vgl. Kap. IV, s. auch Abb. 3b, S. 531: die dargestellte Stickstoff-kalt-Pflanze zeigte eine ausgesprochen starke Umkehrung der Wasseraufnahmewerte: Stickstofffrei-warm 25 cm³, Stickstoff-kalt 36 cm³ Nährlösungsaufnahme). Diese Begünstigung der stickstoffhaltigen Seite ist im Prinzip unabhängig von dem Entwicklungszustand des Wurzelsystems, denn sie tritt ja nicht nur bei den Wurzelsystemen auf, die dauernd im gleichen Substrat blieben und bei denen wir ja in ihrem Wachstum schon eine leichte Verschiebung zugunsten der stickstoffhaltigen Seite bemerkt haben, sondern besonders auch bei den Wurzelsystemen, die infolge eines periodischen Substrataustausches eine gleichmäßige Entwicklung beider Wurzelhälften zeigen. Es ist deshalb auch abwegig, im kalten Gefäß von einer allgemeinen Steigerung der Wasseraufnahme pro Wurzelgewicht zu sprechen, die ja sofort auffällt, wenn man bei einem ständig im gleichen Substrat gebliebenen Wurzelsystem die von dem kleinen kalt gehaltenen Wurzelteil aufgenommene recht beträchtliche Wassermenge mit der von dem viel größeren warm gehaltenen Wurzelteil aufgenommenen Wassermenge vergleicht, denn bei periodischem Austausch der Nährlösungen ist dies ja nicht der Fall. Wir können dies natürlich nur durch die Annahme physiologischer Anpassungsvorgänge bei längerer Kältebehandlung erklären. Nach dieser Erkenntnis der enormen Anpassungsfähigkeit der Wurzel drängt sich einem aber förmlich der Gedanke auf, daß die Bedeutung eines

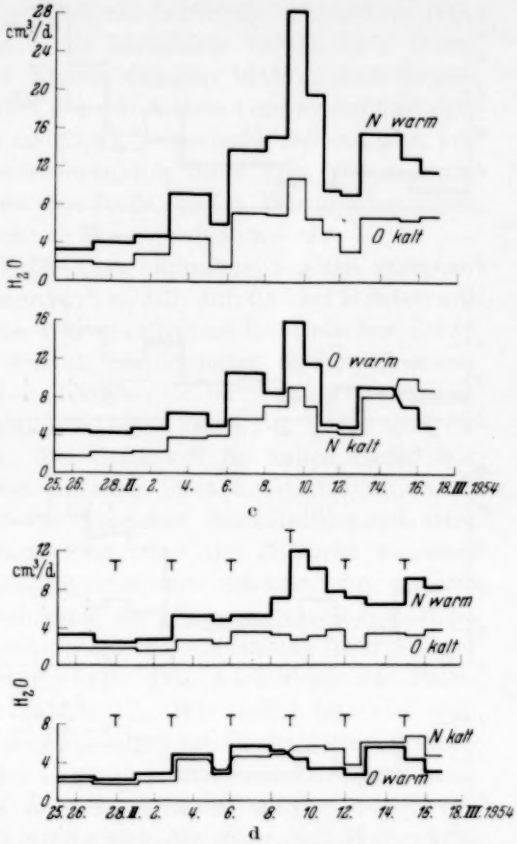


Abb. 4c u. d. Geteiltes Wurzelsystem: Kurven der Wasseraufnahme pro Tag. Bohne 1954. c Nährlösungen nicht ausgetauscht; d Nährlösungen periodisch ausgetauscht

vergrößerten Wurzelsystems in der Natur wohl nicht so sehr in der Möglichkeit einer erhöhten Wasseraufnahme an sich liegt, als vielmehr in der Möglichkeit einer Ausnutzung größerer Wasserreserven im Boden, daß also in einem Boden mit günstigem Wassergehalt eine kleinere Wurzel dieselben Leistungen in bezug auf die Wasseraufnahme vollbringen kann wie eine größere Wurzel in einem wasserarmen Boden. Dasselbe gilt wohl auch für die Nährsalzversorgung. Für diese Annahme spricht, daß auf jedem wasser- und (oder) nährsalzarmen Substrat das Wachstum der Wurzel mindestens im Vergleich zum Sproß (Sproß-Wurzel-Verhältnis) gefördert ist, eine Erscheinung, die wir auch bei unseren Versuchen infolge der durch tiefe Temperatur gehemmten Stickstoffaufnahme finden werden (s. Kap. VIII/2).

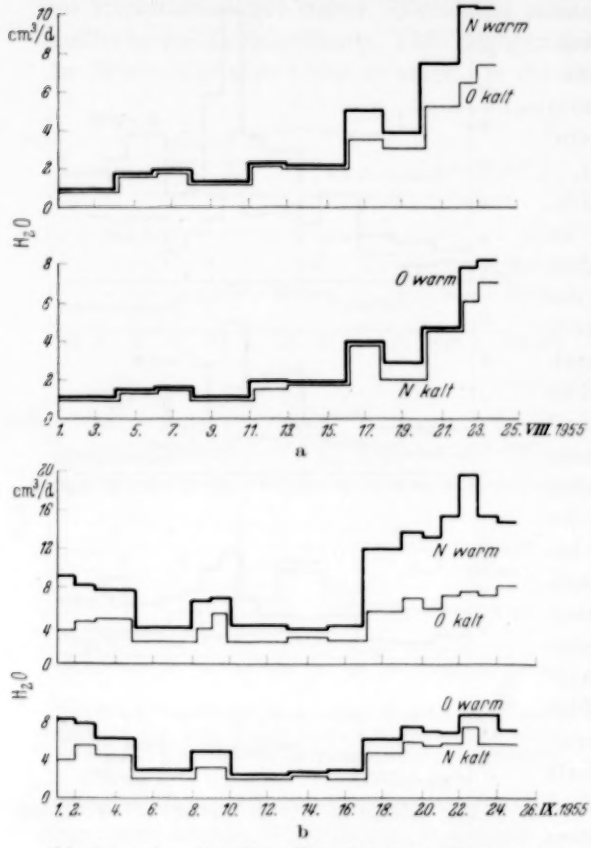


Abb. 5 a u. b. Geteiltes Wurzelsystem: Kurven der Wasseraufnahme pro Tag. a Hafer 1955, b Bohne 1955

Rechnen wir die Wasseraufnahme der warm gehaltenen und die der gekühlten Seite zusammen, so ergibt sich (s. Tabelle 5 und 6), daß die *Gesamtwasseraufnahme* bei Pflanzen mit Stickstoff im kalten Gefäß stets kleiner war als bei denen mit Stickstoff im warmen Gefäß. Dies wurde in erster Linie verursacht durch die Hemmung der Wasseraufnahme aus der stickstofffreien warmen Nährlösung (s. oben). Die Ursache hierfür dürfte weniger in einem geringeren Gesamtwurzelgewicht bei Stickstoff-kalt-Pflanzen liegen — dies war zwar durchweg bei Bohne der Fall, nicht aber bei Hafer — wie in folgender Kausalreihe: Tiefe Temperatur bewirkt eine Hemmung der Stickstoffaufnahme (s. Kap. VI). Stickstoffmangel verzögert aber das Wachstum der Pflanze, also auch die Entwicklung

der Blattfläche. Bleibt aber die Blattfläche kleiner, so ist auch die Transpiration geringer. Bei längerer Versuchsdauer ist aber die transpirierte Wassermenge praktisch gleich der aufgenommenen. Als Beweis dafür wird die auffallende Parallelität zwischen Gesamtnährlösungsverbrauch und Blattflächenentwicklung angesehen (vgl. Gesamtwasseraufnahme Tabelle 6 mit Blattfläche Tabelle 13[1]). Gessner und Schumann-Petersen kamen dagegen 1948 zu dem Ergebnis, daß bei Stickstoffmangel (bei uns durch tiefe Temperatur bedingt) die Fähigkeit der Spalten, sich zu öffnen, weitgehend verlorengeht, was zu einer starken Transpirationseinschränkung führt. Diese Erscheinung mag auch bei unseren Versuchen eine Rolle spielen, dürfte aber nicht die Hauptursache für die gehemmte Wasseraufnahme sein.

Betrachten wir in Tabelle 6 die Wasseraufnahme aus den verschiedenen stickstoffhaltigen Nährlösungen[2], so fällt auf, daß bei Bohnen mit Stickstoff im warmen Gefäß die Wasseraufnahme bei einfacher Stickstoffkonzentration stets höher war als bei doppelter Stickstoffkonzentration (vgl. 1 N mit 2 N + K und 1 N + Ca mit 2 N + Ca). Diese Erscheinung stellte schon Amberger (1955) fest. Bei Hafer sind die Werte jedoch praktisch gleich. Bei Stickstoff im kalten Gefäß war dagegen die Wasseraufnahme bei einfacher Stickstoffkonzentration bei Bohne und Hafer geringer als bei doppelter Stickstoffkonzentration (Erklärung s. Kap. VI). Daraus folgt, daß die *Differenz* zwischen der Gesamtwasseraufnahme der Pflanzen mit Stickstoff im warmen Gefäß und der Gesamtwasseraufnahme der Pflanzen mit Stickstoff im kalten Gefäß *bei doppeltem Stickstoffgehalt* der Nährlösung stets geringer war als bei einfachem Stickstoffgehalt. Die Ausbildung der Blattfläche verhielt sich analog (s. Tabelle 13). Wir treffen hier also erstmals auf eine Angleichung bei doppeltem Stickstoffgehalt, eine Erscheinung, auf die wir in den folgenden Kapiteln immer wieder stoßen werden.

Diese ganzen Verhältnisse wurden ihrerseits wieder durch den Calcium-Faktor überlagert. Es zeigte sich die schon seit Hansteen-Cranner (1914) bekannte Erscheinung, daß auch Calcium die Wasseraufnahme hemmt (vgl. in Tabelle 6 jeweils 1 N mit 1 N + Ca und 2 N + K mit 2 N + Ca bei warm, kalt und gesamt).

Die Versuche mit verschiedenen Nährlösungen wurden nur mit Pflanzen durchgeführt, deren Wurzeln ständig in derselben Nährlösung blieben. Bei den Pflanzen mit periodischem Substrataustausch (s. Tabelle 5) kam es infolge des periodischen Substratwechsels ebenfalls zu einer Angleichung der Wasseraufnahme. Bei Bohnen war die Wasseraufnahme durch Pflanzen mit periodischem Austausch der Nährlösungen stets wesentlich geringer als bei solchen ohne Austausch. Hafer war

[1] Bei den Versuchen des Jahres 1954 wurde die Blattfläche nicht bestimmt.
[2] In Tabelle 6 *kursiv gedruckt*.

unempfindlicher. Dasselbe Verhalten haben wir schon beim Wurzelwachstum kennengelernt. Die Erklärung ist für beide Erscheinungen die gleiche (s. Kap. IV).

Arbeiten wir nun mit ungeteiltem Wurzelsystem (s. Tabelle 7), so wird der Unterschied in der Wasseraufnahme zwischen Stickstoff-warm- und Stickstoff-kalt-Pflanzen extrem groß (seit SACHS 1860 bekannt), denn bei den Stickstoff-kalt-Pflanzen fällt ja jetzt der weitgehend kompensierende Einfluß des stickstofffrei und warm gehaltenen Teils des Wurzelsystems weg. Bei Bohne zeigte sich dies schon äußerlich in einem sehr starken Schlaffwerden der Pflanzen mit gekühltem Wurzelsystem bald nach dem Einsetzen in das Gerät. Über Nacht (tiefere Temperatur, 90 % oder noch mehr relative Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus) wurden die Pflanzen jeweils wieder turgeszent, um am Tage mit zunehmender Einstrahlung wieder zu welken. Dies bedeutet also, daß die sehr geringe Wasseraufnahme bei ca. 90 % relativer Luftfeuchtigkeit gerade noch zum Turgeszentwerden ausreichte, bei geringerer Luftfeuchtigkeit jedoch nicht mehr. Dieses Welkwerden der Bohnen unter dem Einfluß tiefer Temperatur ist ja schon länger bekannt. Interessant ist jedoch die Tatsache, daß auch bei einem Einbringen der Bohnenpflanzen um die Mittagszeit aus dem Gewächshaus (starke Einstrahlung, Lufttemperatur über 30° C) in ein Nordzimmer von 20° starke Welkungserscheinungen auftreten, daß also bei Bohne eine Hemmung der Wasseraufnahme nicht nur kurz über dem Gefrierpunkt, sondern allgemein bei jeder raschen und starken Abkühlung stattfindet. Diese Erscheinung stellten schon BÖHNING und LUSANARDANA (1952) fest. Die Bohnenpflanzen befanden sich bei unseren Versuchen in normalen Reagensgläsern (16/160 mm), so daß sich die Temperatur der Nährlösung rasch der Außentemperatur anglich. Hafer war gegen die rasche Abkühlung unempfindlicher. Er welkte wenigstens äußerlich gesehen kaum. Betrachten wir nun die Wasseraufnahme bei den Hauptversuchen etwas genauer (s. Abb. 6), so fällt bei Bohne kurz nach dem Einsetzen in das Gerät eine besonders starke Hemmung der Wasseraufnahme auf. Nach einigen Tagen wurde sie etwas schwächer, was sich auch äußerlich in einem Turgeszenterwerden der Pflanzen und einsetzendem Wachstum zeigte. Die Dauer dieser stärkeren Hemmungsperiode hing sehr von äußeren Einflüssen ab, denn sie betrug beim hier veröffentlichten Versuch (5.—27. X. 1955) 8 Tage, beim Wiederholungsversuch (14. XI. bis 5. XII. 1955), bei dem

Tabelle 7. *Ungeteiltes Wurzelsystem: Wasseraufnahme in Kubikzentimeter*

Nährlösung	Temperatur	Hafer 1956	Bohne 1955
1 N	warm	122	257
	kalt	18	36
1 N + Ca	warm	116	253
	kalt	15	38
2 N + K	warm	118	226
	kalt	20,5	33
2 N + Ca	warm	123	255
	kalt	21	41

die durchschnittliche Temperatur und die Belichtungsdauer niedriger war, nur 5 Tage. Es lag zuerst nahe, dieses Ansteigen der Wasseraufnahme auf eine zunehmende Schädigung der Bohnenwurzel zurückzuführen. Doch ist dies nicht der Fall, da die Wasseraufnahme des ganzen kalt gehaltenen Wurzelsystems in den ersten Tagen trotz doppelter Größe geringer war als die Wasseraufnahme der Stickstoff-kalt-Wurzelhälfte bei geteiltem Wurzelsystem (zum Beweis wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem beide Versuchsanordnungen nebeneinander liefen). Die Schädigung der Wurzel ging bei kalt gehaltenem Gesamtwurzelsystem und mit Stickstoff versorgtem und gekühltem halbem Wurzelsystem gleichmäßig vor sich (Näheres s. Kap. VII). Wir können uns deshalb die Erscheinung nur so erklären, daß beim Einsetzen der ganzen Bohnenwurzel in das gekühlte Substrat eine Schockwirkung auftrat, ähnlich derjenigen, die wir schon bei einem Wurzelsystem mit periodischem Austausch der Nährlösungen antrafen, und daß diese Schockwirkung durch die warm gehaltene Wurzelhälfte irgendwie abgeschwächt wurde. Bei Hafer war die Wasseraufnahme bei kalt gehaltenem Gesamtwurzelsystem ebenfalls stark gehemmt, doch trat bei ihm die anfängliche Schockwirkung (ähnlich wie bei den Pflanzen mit periodischem Austausch der Nährlösungen) nicht in dem Maße auf (s. Abb. 6). Hafer unserer Provenienz ist also gegen plötzliche Abkühlung ebenfalls stark empfindlich, wenn auch nicht so wie Bohne. Erfrierungserscheinungen treten dagegen bei Hafer nicht auf. Die bei Hafer und Bohne bei Kühlung auftretende starke Hemmung der Wasseraufnahme ist nicht eine Folge des gehemmten Wurzelwachstums (wenn sie auch durch diese verstärkt wird); denn sie trat bei unseren Versuchen schon in den ersten Tagen auf,

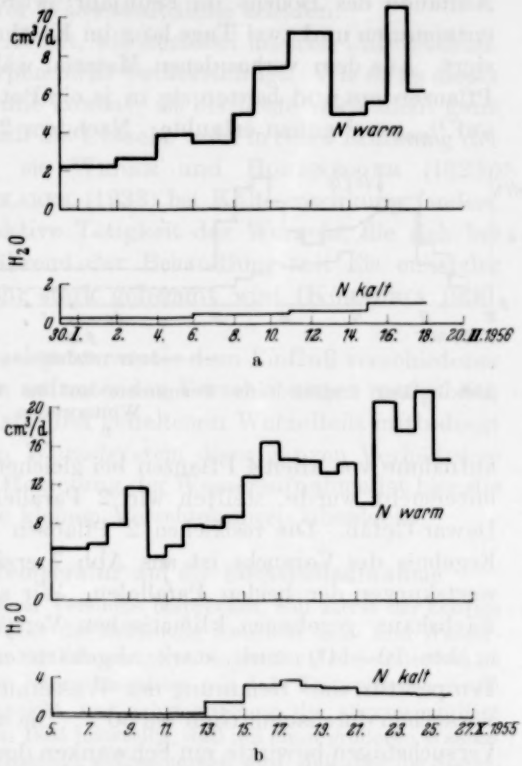


Abb. 6a u. b. Ungeteiltes Wurzelsystem: Kurven der Wasseraufnahme pro Tag. a Hafer 1956, b Bohne 1955

zu einer Zeit also, wo die Wurzelentwicklung bei warm und kalt noch nicht verschieden war. Es war nun die Frage, ob diese Wasseraufnahmehemmung nur eine Folge der bei der Anzucht der Pflanzen herrschenden höheren Temperatur ist. Zweifellos wird der Effekt dadurch vergrößert. Deshalb wurden noch Potometerversuche mit stark abgehärtetem Winterweizen durchgeführt: Zwei bis drei Tage nach dem Auftauen des Bodens im Frühjahr[1] wurde Winterweizen dem Boden entnommen und zwei Tage lang im Kalthaus an Nährlösung akklimatisiert. Aus dem vorhandenen Material wählten wir 4 möglichst gleiche Pflanzen aus und bauten sie in je ein Potometer ein, das eine Ablesung auf $^1/_{1000}$ cm³ genau erlaubte. Nachdem $2^1/_2$ Stunden lang die Wasser-

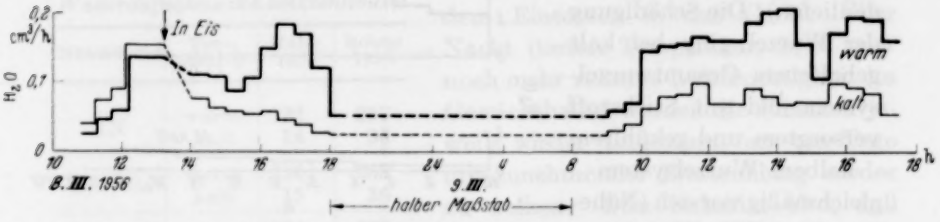


Abb. 7. Der Einfluß tiefer Temperatur auf die Wasseraufnahme von abgehärtetem Winterweizen

aufnahme von allen 4 Pflanzen bei gleicher Temperatur und Exposition untersucht wurde, stellten wir 2 Parallelen in ein mit Eis gefülltes Dewar-Gefäß. Die restlichen 2 Pflanzen wurden nicht gekühlt. Das Ergebnis des Versuchs ist aus Abb. 7 ersichtlich. Es sind die Mittelwertskurven der beiden Parallelen. Wir sehen, daß unter den im Gewächshaus gegebenen klimatischen Verhältnissen (tagsüber 20—23°, nachts 10—14°) auch stark abgehärteter Winterweizen durch tiefe Temperatur eine Hemmung der Wasseraufnahme erleidet, bei unseren Versuchen durchschnittlich um 50%. Die wechselnde Bewölkung an den Versuchstagen bewirkte ein Schwanken der Werte.

Die hohe Empfindlichkeit des Hafers bzw. des Winterweizens ist eigentlich erstaunlich, da man ja weiß, daß beide Arten im Vergleich zur Bohne als kälteunempfindlich gelten. Diese Erscheinung steht aber in Übereinstimmung mit DÖRING (1935), die den ganzen Fragenkomplex gründlich untersucht hat. Sie kam auf Grund ihrer Untersuchungen an 57 Pflanzenarten zu dem Ergebnis, daß zwischen horizontaler und vertikaler Verbreitung der Pflanzen auf der Erde und der Empfindlichkeit ihrer Wasseraufnahme gegen tiefe Temperaturen keinerlei Beziehungen bestehen. Zum Beispiel wurde bei *Viburnum opulus* die Wasseraufnahme bei Kühlung der Wurzel von 20° auf 0° nicht gehemmt, während hierbei die sowohl im Gebirge wie in der Arktis weit

[1] Der Winter 1955/56 war sehr kalt.

vordringende *Picea excelsa* eine Verminderung ihrer Wasseraufnahme um über 35% zeigte. Dagegen verhielten sich nahe verwandte Pflanzenarten sehr ähnlich, so daß Döring zu dem Schluß kam, daß die Empfindlichkeit einer Pflanzenart gegen tiefe Temperaturen primär von ihrer Gattungs- und Familienzugehörigkeit bestimmt wird. Allgemein ließ sich jedoch sagen, daß bei 0° C fast alle untersuchten Pflanzen eine mehr oder weniger starke Hemmung ihrer Wasseraufnahme erleiden.

Allerdings sind bei dieser Arbeit, wie auch bei unseren Untersuchungen, die verschiedenen Ökotypen nicht berücksichtigt. Wie es zu dieser Hemmung der Wasseraufnahme kommt, ist bis heute noch nicht ganz sicher. Döring vermutete, daß die Ursache wohl in einer Erhöhung der Plasmaviscosität liegt, wie sie Weber und Hohenegger (1923), Bělehrádek (1928) und Pekarek (1933) bei Kälteeinwirkung fanden. Sicher ist jedoch, daß die aktive Tätigkeit der Wurzeln, die sich bei Blutungsversuchen zeigt, während der Behandlung mit Eis entweder völlig aussetzt oder doch sehr stark gehemmt wird (Köhnlein 1930, Heyl 1933, Döring 1935).

Da die bei geteiltem Wurzelsystem unter dem Einfluß verschiedener Calcium- und Stickstoffgaben auftretenden Verschiebungen maßgeblich durch die Tätigkeit des stickstofffrei gehaltenen Wurzelteils mitbedingt sind, werden bei ungeteiltem Wurzelsystem diese ganzen Verhältnisse oft undeutlich. Die extreme Hemmung der Wasseraufnahme ist hier die zentrale Erscheinung, die alle kleinen Verschiebungen überdeckt.

VI. Der Einfluß tiefer Temperatur auf die Stickstoffaufnahme

Bevor wir die Ergebnisse unserer Versuche besprechen, soll zuerst der heutige Stand der Grundlagenforschung über die Beziehung zwischen Salz- und Wasseraufnahme betrachtet werden. Für die Pflanzenphysiologen der Jahrhundertwende war es selbstverständlich, daß die Nährsalze passiv mit dem Transpirationsstrom aufgenommen werden. Diese Ansicht war jahrzehntelang die allgemeingültige Lehrmeinung, obwohl Wolf schon 1864 feststellte, daß mit einer größeren Wassermenge zwar auch eine größere Salzmenge aufgenommen wird, daß aber die Steigerung der Salzaufnahme der Steigerung der Wasseraufnahme nicht proportional ist. Den entscheidenden Umschwung brachten erst die Arbeiten von Hasselbring (1914), Kiesselbach (1916), Mendiola (1922), Muenscher (1922) und Huber (1923), die, wie später auch Kreyzi (1932) und Gračanin (1932a), eine Unabhängigkeit der Salz- von der Wasseraufnahme fanden. Heute hat man jedoch auch diesen extremen Standpunkt fast allgemein wieder verlassen. Haas und Reed (1927), Schmidt (1936), Freeland (1936 und 1937), Jahnel (1938), Wright (1939), Böttcher und Behling (1940), Phillis und Mason (1940), Wienhues (1941) und Petrischek (1953) zeigten nämlich, daß die Aufnahme der meisten Salze (auch die des Stickstoffs) weder unabhängig noch proportional zur Wasseraufnahme erfolgt, sondern daß bei erhöhter Wasseraufnahme die Salzaufnahme zwar absolut steigt, bezogen auf die Wasseraufnahme aber fällt. Diese Ansicht vertritt heute auch Huber (1953). Allerdings dürfen wir nicht verallgemeinern, denn die Abhängigkeit der Salzaufnahme von der Wasseraufnahme ist je nach Ion verschieden. Zum Beispiel ist auch heute noch fast unbestritten, daß die Aufnahme des Calcium-

Ions weitgehend proportional zur Wasseraufnahme erfolgt (BURSTRÖM 1934, WRIGHT 1939, BÖTTICHER und BEHLING 1940, NEARPASS und DROSDORFF 1952), wenn auch die Ca-Aufnahme zusätzlich von gleichzeitig vorhandenem Kalium reguliert werden dürfte (EHRENBERG 1919 und LUNDEGÅRDH 1932). Völlig aus der Reihe fallen hier nur die Arbeiten von AULICH (1936), der bei Verwendung reiner $CaCl_2$-Lösungen eine Exponentialbeziehung fand, und die von SHERWOOD, HALVERSON, WOODHOUSE und SMITH (1947), die keinen Einfluß des Kalkgehalts des Bodens auf den Ca-Gehalt der Pflanze fanden. Für die große Zahl der Ionen dürften aber die erstgenannten Verhältnisse zutreffen. Sehr strittig ist jedoch noch immer, wie es zu diesen Beziehungen kommt. PETRISCHEK (1953), HUBER (1953) und HYLMÖ (1953 und 1955) sind der Ansicht, daß die Salzaufnahme aus 2 Teilen besteht, wobei der erste unabhängig, der zweite proportional zur Transpiration verläuft. Für diese Ansicht spricht auch die Tatsache, daß es möglich ist, einerseits durch Anwendung eines osmotischen Gegensogs in der Außenlösung die Wasseraufnahme ohne Beeinflussung der Salzaufnahme stark zu drosseln (LONG 1943) und andererseits durch Zugabe besonderer Atmungsgifte (2,4-Dinitrophenol, KCN,N_2) die Anionenaufnahme ohne Beeinflussung der Wasseraufnahme zu hemmen (BUTLER 1953, BROUWER 1954b), was also auf eine gewisse Unabhängigkeit beider Prozesse hindeutet. BROUWER (1953, 1954) bestätigt dagegen die Angaben von BREWIG (1937), daß eine lebhafte Wasserdurchströmung die Wurzelpermeabilität erhöht und sieht in dieser Erscheinung die Ursache für das gegebene Phänomen. Selbst bei Annahme einer rein aktiven Ionenaufnahme (LUNDEGÅRDH und BURSTRÖM 1933, v. D. HONERT 1933 und 1936, HOAGLAND und BROYER 1936, LUNDEGÅRDH 1940, BROYER und HOAGLAND 1943, HOAGLAND 1944, 2. Auflage 1948 u. a.) würden dann bei stärkerer Wasserdurchströmung pro Atmungsenergiemenge mehr Ionen aufgenommen als bei geringerer Wasseraufnahme. v. D. HONERT, HOOYMANS und VOLKERS (1955) lehnen dagegen wie auch HOAGLAND (Literatur s. oben) den Einfluß der Transpiration auf die Salzaufnahme ganz ab, allerdings einen „constant status of the plant" vorausgesetzt, also nur bei kurzfristigen Versuchen, bei denen die Pflanzen keine Zeit haben „to change their mind". Für länger dauernde Versuche wird jedoch ein Einfluß nicht abgelehnt, denn durch erhöhte Wasseraufnahme würden die in der Wurzel gespeicherten Salze abtransportiert und wegen der dadurch in der Wurzel stattfindenden Salzkonzentrationsabnahme die Salzabsorption erhöht (in Anlehnung an HOAGLAND und BROYER 1942 u. a.). Allerdings dürften auch bei kurzfristigen Versuchen die Ergebnisse von v. D. HONERT und Mitarbeitern keine allgemeine Gültigkeit haben, denn BROUWER und HYLMÖ fanden bei einer etwas verschiedenen Versuchsanordnung wieder einen Einfluß der Transpiration. Die Schule HOAGLANDS, die zu den gleichen Ergebnissen kam wie v. D. HONERT, arbeitete dagegen unter ganz anderen Bedingungen, nämlich mit isolierten Wurzeln. Welche dieser 3 dargelegten Ansichten sich durchsetzen wird, läßt sich heute noch nicht sagen.

Betrachten wir die in unseren Versuchen erhaltenen Werte (Tabellen 8 bis 10), so stellen wir bei allen Versuchsanordnungen fest, daß die Gesamtstickstoffaufnahme bei tiefer Temperatur stets stark gehemmt war. Daß diese Hemmung keine Folge des verschieden entwickelten Wurzelsystems war, geht aus den Versuchen mit periodisch ausgetauschten Nährlösungen hervor, bei denen es zwar im Vergleich mit den Versuchen ohne Substrataustausch jeweils zu einer gewissen Annäherung der Stickstoffaufnahme zwischen warm und kalt kam, wodurch sich aber am Phänomen an sich nichts änderte. Dieses Ergebnis ist ja absolut

Tabelle 8. *Geteiltes Wurzelsystem: Stickstoffaufnahme in Milligramm*

Nährlösung		a) Nährlösungen nicht ausgetauscht		b) Nährlösungen periodisch ausgetauscht	
warm	kalt	Gesamt	pro 10 cm³ Nährlösung	Gesamt	pro 10 cm³ Nährlösung
		Hafer 1954			
1N	0	12,4	3,02	8,6	2,60
0	1N	5,5	2,20	6,6	2,06
		Bohne 1954			
1N	0	40,3	1,78	20,3	1,64
0	1N	16,0	1,44	11,7	1,41

Tabelle 9. *Geteiltes Wurzelsystem: Stickstoffaufnahme in Milligramm*

Nährlösung		Hafer 1955		Bohne 1955	
warm	kalt	Gesamt	pro 10 cm³ Nährlösung	Gesamt	pro 10 cm³ Nährlösung
1N	0	27,5	2,81	69,7	2,61
0	1N	10,9	1,85	14,3	1,61
1N + Ca	0	25,8	2,90	65,3	2,84
0	1N + Ca	10,6	1,96	14,0	1,65
2N + K	0	29,5	2,90	66,1	3,13
0	2N + K	23,8	3,02	34,6	2,93
2N + Ca	0	26,3	2,96	62,9	3,24
0	2N + Ca	23,0	3,33	30,8	3,02

Tabelle 10. *Ungeteiltes Wurzelsystem: Stickstoffaufnahme in Milligramm*

Nährlösung	Temperatur	Hafer 1956		Bohne 1955	
		Gesamt	pro 10 cm³ Nährlösung	Gesamt	pro 10 cm³ Nährlösung
1N	warm	22,9	1,88	57,2	2,22
	kalt	3,7	2,06	5,9	1,64
1N + Ca	warm	22,5	1,94	57,3	2,26
	kalt	3,8	2,53	6,8	1,79
2N + K	warm	28,3	2,40	59,9	2,65
	kalt	5,4	2,70	10,2	3,09
2N + Ca	warm	28,8	2,34	65,4	2,56
	kalt	7,3	3,48	13,4	3,27

nicht neu und wurde schon von SCHMID 1930, DADYKIN 1950a, ZURBIKIJ und STRAUSBERG 1954 u. a. gefunden. Die Frage war hier nur: Ist diese Hemmung nur eine Folge der bei tiefer Temperatur stark gedrosselten Wasseraufnahme (Angaben über Wasseraufnahme fehlen bei

den angeführten Autoren ganz), oder ist sie auch unabhängig von der aufgenommenen Wassermenge vorhanden? Aufschluß gibt hier die Berechnung der relativen Stickstoffaufnahme[1]. Betrachten wir zuerst die Werte für einfache Stickstoffmenge, also für eine Nährlösung, die normalerweise als optimal gilt, so besteht kein Zweifel, daß bei *einfacher Stickstoffgabe* unter dem Einfluß tiefer Temperatur die *Stickstoffaufnahme* auch *pro aufgenommener Nährlösungsmenge* stark gehemmt war. Die Hemmung war sogar wesentlich stärker als die angegebenen Werte zeigen, da die relative Stickstoffaufnahme ja, wie schon oben erwähnt, mit abnehmender Wasseraufnahme steigt. Bei Exemplaren mit periodisch ausgetauschten Nährlösungen kam es wieder zu einer leichten Angleichung.

Als wir nun aber aus den in Kap. II 2 (Methodik) angegebenen Gründen den Stickstoffgehalt der einen Seite durch eine äquivalente $Ca(NO_3)_2$-Menge verdoppelten, änderte sich plötzlich das Bild sehr stark. Um den Stickstoffaktor und den Calciumfaktor zu trennen, arbeiteten wir daraufhin mit 4 verschiedenen Nährlösungen: 1 N, 1 N + Ca, 2 N + K und 2 N + Ca (Erklärung s. Kap. II 2). Das Ergebnis war folgendes (s. Tabelle 9 und 10): Die Stickstoffaufnahme pro aufgenommener Nährlösungsmenge stieg *bei doppeltem Stickstoffgehalt* des Substrats gegenüber einfachem Stickstoffgehalt bei warmer Nährlösung nur noch verhältnismäßig wenig an, bei kalter jedoch sehr stark, so daß bei doppeltem Stickstoffgehalt der relative Stickstoff-kalt-Wert[1] den relativen Stickstoff-warm-Wert je nach gleichzeitiger Wasseraufnahme entweder fast erreichte oder sogar leicht übertraf. Im einzelnen waren die Werte etwas verschieden. So konnte sich schon bei einfachem Stickstoffgehalt die relative Stickstoffaufnahme aus stickstoffhaltiger kalter Nährlösung infolge der geringen Wasseraufnahme dem entsprechenden relativen Stickstoff-warm-Wert angleichen, doch verschob sich dabei die relative Stickstoffaufnahme bei doppeltem Stickstoffgehalt gleichsinnig, nämlich so, daß die Steigerung der relativen Stickstoffaufnahme bei doppelter Stickstoffmenge-kalt gegenüber einfacher Stickstoffmenge-kalt in jedem Fall viel höher war als die bei doppelter Stickstoffmenge-warm gegenüber einfacher Stickstoffmenge-warm. Dies ist die allgemeine Regel, der sich alle Versuchsergebnisse unterordnen lassen. Wenn wir nun versuchen, die Ergebnisse unabhängig von der Wasseraufnahme zu betrachten, so müssen wir unsere Aussage so formulieren: Bei doppeltem Stickstoffgehalt war, unter der Voraussetzung gleicher aufgenommener Wassermenge, die Stickstoffaufnahme pro aufgenommener Wassermenge bei Eiskühlung auch gehemmt, allerdings wesentlich weniger als bei einfacher Stickstoffmenge. Bei Hafer war diese Hemmung geringer als bei Bohne (vgl. in Tabelle 11 jeweils die Differenz zwischen

[1] Bezogen auf 10 cm^3 aufgenommene Nährlösung.

Tabelle 11. *Geteiltes Wurzelsystem: Die Beziehungen zwischen Wasser- und relativer Stickstoffaufnahme durch die jeweiligen Wurzelhälften in Abhängigkeit von der Temperatur*

Nährlösung	Temperatur	Hafer 1955		Bohne 1955	
		Nährlösungsaufnahme in cm^3	Stickstoffaufnahme in mg pro 10 cm^3 Nährlösung	Nährlösungsaufnahme in cm^3	Stickstoffaufnahme in mg pro 10 cm^3 Nährlösung
1 N	warm	98	2,81	267	2,61
	kalt	59	1,85	89	1,61
1 N + Ca	warm	89	2,90	230	2,84
	kalt	54	1,96	85	1,65
2 N + K	warm	102	2,90	211	3,13
	kalt	79	3,02	118	2,93
2 N + Ca	warm	89	2,96	194	3,24
	kalt	69	3,33	102	3,02

der Wasseraufnahme aus warmem Substrat mit doppeltem Stickstoffgehalt und kaltem Substrat mit doppeltem Stickstoffgehalt mit der Differenz zwischen den entsprechenden relativen Stickstoffwerten [1]). Da bei höheren Temperaturen, wie wir in Kap. VIII sehen werden, einfache Stickstoffmenge für das Wachstum optimal, doppelte Stickstoffmenge dagegen schon etwas überoptimal war, bei tiefer Temperatur dagegen die Pflanzen bei doppelter Stickstoffmenge besser wuchsen, müssen wir ganz allgemein feststellen: *Eine Stickstoff-Konzentration, die bei höherer Temperatur optimal war, war bei tiefer Temperatur noch nicht optimal.* Dies trat in bezug auf das Wachstum allerdings nur dann deutlich hervor, wenn die Pflanze mit Stickstoff im kalten Gefäß nicht gleichzeitig unter extremer Hemmung ihrer Wasseraufnahme litt, denn dadurch wurde der ganze Stickstoffaktor weitgehend überdeckt. Wir erhielten deshalb in dieser Beziehung die besten Ergebnisse bei den Pflanzen, die ihren Wasserdefizit durch einen in stickstofffreier Nährlösung hängenden Wurzelteil kompensieren konnten. Hafer ist ja im Vergleich zur Bohne gegen Kälte ziemlich unempfindlich, doch wurde trotzdem bei unseren Versuchspflanzen die Wasseraufnahme durch tiefe Temperatur stark gedrosselt (wenn auch nicht ganz so stark wie bei Bohnen). Bedeutungsvoll dürfte dieses Ergebnis dagegen für die arktische und hochalpine Flora sein, besonders vielleicht für das Problem der hochalpinen Lägerflora, die ja gegenüber den Matten durch ihre wesentlich höhere Massenproduktion auffällt. Daß es sich dabei gegenüber den Matten um andere Pflanzenarten handelt, spielt prinzipiell keine Rolle.

[1] Bei der vergleichenden Durchrechnung der Einzelwerte der Parallelen konnte festgestellt werden, daß bei gleichem Substrat und gleicher Temperatur eine Erhöhung der Wasseraufnahme um 50% eine Steigerung der Stickstoffaufnahme durchschnittlich um etwa 20% bewirkte.

DADYKIN (1950a) und GRIGORJEVA (1953) haben ja bei arktischen Pflanzen gefunden, daß diese keinen Wassermangel leiden und normal transpirieren, während jedoch STOCKER (1932) ebenfalls durch Transpirationsmessungen feststellte, daß die Wasseraufnahme oft, jedoch nicht immer, unzureichend ist. Dies führte dazu, daß man für diese Region in der Folgezeit der Nährsalzversorgung erhöhte Bedeutung zumaß. Als erster wies wohl SØRENSEN (1941) auf Grund seiner Untersuchungen auf Grönland nachdrücklich auf die Bedeutung des Stickstoffs hin ("... in the Arctic the question as to the supply of nitrogen becomes burning", S. 13). Die Versuche von DADYKIN waren dann nur die direkte Bestätigung dieser Ansicht. Leider sind die Forschungen auf diesem Gebiet bis jetzt nicht über Anfänge hinausgekommen, so daß sich heute noch nicht sagen läßt, wieweit unsere Ergebnisse auf die Natur übertragbar sind.

Wie beim Wasserhaushalt wurden auch bei der Stickstoffaufnahme die Beziehungen zwischen einfachem und doppeltem Stickstoffgehalt durch den Calcium-Faktor überlagert. Es ist ja schon seit einiger Zeit bekannt, daß Calcium die Stickstoffaufnahme fördert. Einwandfreie Beweise lieferten für dieses Verhalten WIENHUES (1941), NICKOLAY (1941) und besonders BURSTRÖM (1954) auf Grund von Untersuchungen an Wasserkulturen[1], während die zum gleichen Ergebnis führenden Freilandversuche von PARKER und TROUG (1920), NĚMEC (1940), HARLEY (1949) und WAHHAB und SHAH (1952) in dieser Beziehung nicht eindeutig sind, da die Wirkung des Kalkes hier auch auf einer Verbesserung des Bodens und damit einer Aktivierung des Bodenlebens beruhen kann. Analog stellten GASSNER und FRANKE (1934) einen hemmenden Einfluß des Kaliums fest. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen bewirkte ein erhöhter Calciumgehalt des Substrats, mindestens unter Voraussetzung gleicher Wasseraufnahme, bei uns im allgemeinen ein leichtes Ansteigen der relativen Stickstoffaufnahme und zwar bei einfacher und doppelter Stickstoffmenge, warm und kalt (s. Tabelle 9 und 10, vgl. eventuell mit Tabelle 6 und 7). Daß die Gesamtstickstoffaufnahme bei den Versuchen mit geteiltem Wurzelsystem trotzdem aus dem calciumreicheren Substrat niedriger war als aus dem calciumärmeren, war eine Folge der geringeren Wasseraufnahme, die ja die Gesamtstickstoffaufnahme stets wesentlich beeinflußt. Am Phänomen ändert dies aber nichts.

VII. Schädigungen der Bohnenwurzeln durch Temperaturen knapp über 0° C und ihr Einfluß auf die Wasser- und Stickstoffaufnahme

Wir haben in den vorhergehenden Kapiteln die Wasser- und Stickstoffaufnahme der Bohne genau so behandelt wie die des Hafers, obwohl

[1] LUNDEGÅRDH und MORAVEK (1924) und DIKUSSAR (1930) konnten dagegen keinen Einfluß feststellen.

die Bohnenwurzel im Gegensatz zur Haferwurzel durch tiefe Temperatur geschädigt wird. Es erwies sich mit der Zeit, daß diese Schädigung doch recht beträchtlich war, wenn auch die Wasser- und Stickstoffaufnahme sich in allen wesentlichen Punkten genau gleich wie bei Hafer verhielt. Nach unseren Feststellungen sterben nämlich im Laufe der 3—4wöchigen Kältebehandlung die 2—3 äußersten Rindenzellschichten allmählich ab. Dieser Vorgang zeigt sich schon äußerlich in einem Schlafferwerden der Wurzel, da die äußersten Rindenzellen ja das für die Turgeszenz der Wurzel wesentlichste Element sind. Unter dem Mikroskop erweisen sich diese Zellen als mit Methylenblaulösung anfärbbar (Methode s. JANKE 1946). Es mußte somit die Frage geklärt werden, ob dadurch die Wasser- und Stickstoffaufnahme grundsätzlich geändert wird. Dies ist nicht der Fall, wie folgende Versuche zeigen:

1. Wasserfaktor

α) Wurden Bohnen mit lebenden Wurzeln in ihren mit Nährlösung gefüllten Reagensgläsern in Eis gestellt, so welkten sie erwartungsgemäß.

β) Wurde die ganze Wurzel mit kochendem Wasser (ca. 6—8 sec) abgetötet, so blieben die Pflanzen bei Eiskühlung der Wurzel voll turgeszent, selbst bei 26,2° und 37% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Bohnen mit ganz abgetöteten Wurzeln saugten ungehemmt[1]. Bei starker Sonneneinstrahlung, wenn selbst Pflanzen mit lebenden Wurzeln bei Zimmertemperatur etwas schlaff wurden, blieben sie turgeszent. Ihre Wasseraufnahme war dann trotz Eiskühlung sogar etwas größer als die der ungeschädigten Pflanzen ohne Kühlung (durch Potometerversuche nachgewiesen). Allerdings gilt dies nur für die ersten ca. 3 Tage nach dem Abtöten, dann ging die Wurzel allmählich so stark in Fäulnis über, daß die Wassernachleitung aufhörte und die Pflanze welkte.

γ) Bei unseren Versuchen verhielten sich die Pflanzen mit geschädigten äußeren Rindenschichten noch ganz wie unter α) (vgl. Stickstoff-warm und Stickstoff-kalt in Tabelle 7 bzw. Abb. 6). Man kann auch durch sehr kurzes Eintauchen der Bohnenwurzeln in fast kochendes Wasser eine partielle Abtötung der äußeren Rinde erreichen, die dem Zustand nach 3wöchiger Kälteeinwirkung in allen Einzelheiten gleicht: Die Wurzel wird schlaff und die äußersten Rindenschichten färben sich mit Methylenblau an. Brachte man diese Pflanzen in Eis, so wurden auch sie welk, vorausgesetzt, daß man ihnen genügend Zeit ließ (ca. 1 Tag), den durch das kurze Abbrühen hervorgerufenen Schock zu überwinden.

Bei den unter verschiedenen Bedingungen (verschiedener Temperatur, verschiedener relativer Luftfeuchtigkeit) durchgeführten Versuchen wurden stets die Wurzeln je einer Pflanze mit ganz lebenden,

[1] GESSNER stellte 1954 bei emersen Wasserpflanzen fest, daß durch Abtöten der Wurzel der Filtrationswiderstand gegenüber Wasser sinkt.

Tabelle 12. *Geteiltes Wurzelsystem: Stickstoffaufnahme der Bohnen bei 3 Kurzversuchen (je 1 Pflanze)*

Nährlösung warm	Nährlösung kalt	21.—22. VII. 1955 Nährlösungsverbrauch in cm³ warm	21.—22. VII. 1955 Nährlösungsverbrauch in cm³ kalt	21.—22. VII. 1955 N-Aufnahme in mg Gesamt	21.—22. VII. 1955 N-Aufnahme in mg pro 10 cm³ Nährlösung	24.—25. VII. 1955 Nährlösungsverbrauch in cm³ warm	24.—25. VII. 1955 Nährlösungsverbrauch in cm³ kalt	24.—25. VII. 1955 N-Aufnahme in mg Gesamt	24.—25. VII. 1955 N-Aufnahme in mg pro 10 cm³ Nährlösung	17.—19. XI. 1955 Nährlösungsverbrauch in cm³ warm	17.—19. XI. 1955 Nährlösungsverbrauch in cm³ kalt	17.—19. XI. 1955 N-Aufnahme in mg Gesamt	17.—19. XI. 1955 N-Aufnahme in mg pro 10 cm³ Nährlösung
1N	0	8,4	3,9	2,10	2,50	11,0	4,5	1,94	1,76	4,4	2,1	1,22	2,77
0	1N	5,3	2,6	0,47	1,81	5,0	5,1	0,76	1,49	4,9	1,5	0,39	2,60
1N+Ca	0	4,9	3,1	1,19	2,43	4,9	3,4	0,94	1,92	4,8	2,0	1,28	2,67
0	1N+Ca	11,0	3,2	0,66	2,06	10,7	5,7	0,81	1,42	4,3	2,0	0,55	2,25
2N+K	0	9,9	4,3	2,50	2,53	7,7	3,4	2,22	2,88	7,7	1,7	2,47	3,21
0	2N+K	4,9	5,3	1,58	2,98	13,5	9,3	2,55	2,74	4,4	1,25	0,62	4,96
2N+Ca	0	3,2	2,8	1,07	3,34	3,2	2,6	1,03	3,22	3,7	1,2	1,24	3,35
0	2N+Ca	7,1	5,1	1,60	3,14	6,7	5,2	1,48	2,85	4,9	1,9	0,83	4,37

ganz toten und z. T. toten Wurzeln gleichzeitig bei gleicher Exposition abgekühlt, um bei allen 3 Parallelen gleiche Bedingungen zu haben. Wir sehen also, daß sich eine Bohne mit geschädigten äußeren Wurzelrindenschichten wie eine mit ungeschädigten Wurzeln verhält und ganz anders als eine mit toten Wurzeln.

2. *Stickstoffaktor*

Bei Bohnen mit ganz abgetöteter Wurzel strömte die Nährlösung unverändert in die Wurzel ein[1]. Um genaue Werte zu erhalten, mußte man jedoch die Fäulnis der durch das längere Kochen oberflächlich angegriffenen Wurzel durch Zusatz von etwas Toluol verhindern. Bohnen mit abgetöteter äußerster Wurzelrinde zeigten aber auch bei Toluolzusatz keinen Eintritt unveränderter Nährlösung. Aus den Tabellen 8—10 ist ersichtlich, daß auch bei den geschädigten Wurzeln der Hauptversuche die Ionenaufnahme nicht passiv erfolgte. Dies gilt nicht nur für die hier angegebenen Endwerte der Versuche, sondern auch für alle bei Nährlösungswechsel (s. S. 527) erzielten Zwischenergebnisse. Um etwaigen Einwänden zu begegnen, wurden noch Kurzversuche durchgeführt, bei denen die Bohnen

[1] Dies wurde freilich nur in bezug auf die Stickstoffaufnahme untersucht.

bei gleicher Versuchsanordnung wie bei den Hauptversuchen in kleine, 14 cm^3 Nährlösung fassende Reagensgläser gesetzt wurden. Dadurch war es möglich, bei großer Genauigkeit der Ergebnisse die Versuche je nach Witterung schon nach 1—2 Tagen abzubrechen, zu einer Zeit also, da die Bohnenwurzeln im kalten Gefäß noch keinerlei Schädigungen zeigten. Auch diese Werte (s. Tabelle 12) bestätigten voll die für die Stickstoffaufnahme in Tabelle 9 dargelegten und in Kapitel VI erläuterten Ergebnisse der Hauptversuche. Leider schwankte bei den Kurzversuchen die Wasseraufnahme stark, was sich natürlich auch auf die Stickstoffaufnahme auswirkte. Das gesuchte Phänomen trat aber trotzdem klar heraus.

VIII. Der Einfluß tiefer Temperatur auf das Wachstum und die morphologische und anatomische Struktur

1. Quantitative Wachstumsbeeinflussungen

Die Frischgewichtszunahme war bei den vorliegenden Versuchen in erster Linie von 2 Faktoren abhängig: 1. von der Wasseraufnahme, 2. von der Stickstoffaufnahme. Da beide aber durch tiefe Temperatur gehemmt wurden, war auch (s. Tabelle 13) die Gewichtszunahme bei Stickstoff-kalt stets geringer als bei Stickstoff-warm (s. auch Tabelle 14 und 15). Ferner ergab sich, daß für das Wachstum bei *Stickstoff im warmen Gefäß* die *einfache Stickstoffmenge optimal*, die doppelte Stickstoffmenge meist bereits nicht mehr optimal war (nach Baumeister 1955 folgt die CO_2-Assimilation bei steigenden Stickstoffgaben einer Optimumkurve). Bei Stickstoff-kalt wirkte sich ein erhöhter Stickstoffgehalt des Substrats, wie wir gesehen haben, sowohl auf die Stickstoff- wie auf die Wasseraufnahme günstig aus, was natürlich auch zu einer Steigerung der Gewichtszunahme führte. Bei *Stickstoff im kalten Gefäß* war also eine *einfache Stickstoffmenge noch nicht optimal*. Beides führte bei doppelter Stickstoffmenge zu einer deutlichen Angleichung der Gewichte (sehr gut trat dies auch in der Sproßlänge heraus, s. Tabelle 13). Auffallend war jedoch die — bezogen auf die Stickstoffaufnahme — starke Gewichtszunahme bei Stickstoff-kalt, besonders bei einfacher Stickstoffmenge-kalt und zwar hier verglichen mit einfacher Stickstoffmenge-warm wie mit doppelter Stickstoffmenge-kalt. Daß jedoch die Pflanzen mit einfacher Stickstoffmenge-kalt unter extremem Stickstoffmangel litten, zeigte sich in der bei Bohne auftretenden Chlorose (s. auch Judkins und Wandler 1950). Die Bohnen mit doppelter Stickstoffmenge im gekühlten Gefäß unterschieden sich dagegen in der Blattfarbe von den Pflanzen mit einfacher oder doppelter Stickstoffmenge im warmen Gefäß nicht oder nur sehr wenig. Hafer zeigte bei geteiltem Wurzelsystem infolge seiner geringeren Empfindlichkeit keine Chlorose.

Eine erhöhte Calciumgabe wirkte im allgemeinen hemmend auf das Wachstum der Pflanze. Dies steht zwar im Gegensatz zu den Freiland-

Tabelle 13. *Geteiltes Wurzelsystem: Entwicklungszustand der Pflanzen am Ende des Versuchs*

Hafer 1955

Nährlösung		Frischgewicht in g					Länge der Blattscheiden in cm					Zahl der Bestokkungsausschläge	Länge des längsten (5.) Blattes in cm	Blattfläche[1] in cm²
warm	kalt	Sproß	Wurzel Gesamt	Gesamt	Gewichtszunahme	Gewichtszunahme / Anfangsgewicht	Hauptsproß	+ Seitensprosse	= Gesamt	Zuwachs				
1N	0	4,44	1,86	6,30	5,70	9,5	28,2	+ 8,0	= 36,2	29,2		2	36,0	88
0	1N	2,99	1,87	4,86	4,26	7,1	24,5	+ 0,1	= 24,6	17,9		1/3	30,8	63
1N+Ca	0	4,13	1,77	5,90	5,32	9,2	28,4	+ 5,7	= 34,1	26,7		1 2/3	35,8	83
0	1N+Ca	2,71	1,79	4,50	3,91	6,6	22,2	+ 0,3	= 22,5	15,5		1/3	28,0	61
2N+K	0	4,39	2,17	6,56	5,94	9,6	25,3	+ 5,3	= 30,6	23,8		1 1/3	38,1	90
0	2N+K	3,58	1,67	5,25	4,71	9,7	25,5	+ 3,1	= 28,6	22,0		1	34,4	75
2N+Ca	0	3,83	1,71	5,54	4,96	8,4	27,8	+ 0	= 27,8	20,8		0	36,5	75
0	2N+Ca	3,34	1,91	5,25	4,65	7,7	26,8	+ 0	= 26,8	19,8		0	33,8	70

Bohne 1955

Nährlösung		Frischgewicht in g					Sproßlänge in cm				Blattfläche in cm²
warm	kalt	Sproß	Wurzel Gesamt	Gesamt	Gewichtszunahme	Gewichtszunahme / Anfangsgewicht	Hauptsproß	+ Seitensprosse	= Gesamt	Zuwachs	
1N	0	15,40	8,19	23,59	19,51	4,8	36,8	+ 15,8	= 52,6	35,9	496
0	1N	8,25	6,57	14,82	10,67	2,6	29,9	+ 6,5	= 36,4	20,1	260
1N+Ca	0	13,96	9,09	23,05	18,99	4,7	36,3	+ 15,6	= 51,9	35,6	402
0	1N+Ca	8,12	6,90	15,02	11,08	2,8	29,2	+ 6,1	= 35,3	18,9	224
2N+K	0	13,10	8,45	21,55	17,55	4,3	35,8	+ 13,6	= 49,4	32,4	357
0	2N+K	11,10	7,21	18,31	14,31	3,6	35,1	+ 9,0	= 44,1	27,3	335
2N+Ca	0	11,40	7,59	18,99	14,95	3,7	35,4	+ 10,4	= 45,8	29,2	331
0	2N+Ca	10,35	6,41	16,76	12,69	3,1	33,1	+ 9,1	= 42,2	25,7	308

[1] Die angegebenen Blattflächenwerte beziehen sich nur auf die am Schluß des betr. Versuchs lebenden Blätter. Während des Versuchs abgestorbene Blätter wurden nicht berücksichtigt.

erfahrungen von SHERWOOD, HALVERSON, WOODHOUSE und SMITH (1947) und HARLEY (1949), doch lassen sich die Verhältnisse nicht direkt vergleichen, da bei den ersteren Autoren die Ursache wohl in einer bodenverbessernden Wirkung des Kalkes zu suchen ist, bei letzterem aber der kalkarme Boden gleichzeitig auch stickstoffärmer war.

Die Pflanzen in periodisch ausgetauschter Nährlösung waren durchweg leichter als diejenigen, deren Wurzeln ständig im gleichen Substrat blieben (s. Tabelle 14). Diese Erscheinung haben wir schon in den vorhergehenden Kapiteln besprochen. Hafer erwies sich auch in dieser Beziehung gegen periodischen Nährlösungsaustausch, d. h. gegen den damit verbundenen periodischen Kälteschock, unempfindlicher als Bohnen.

Verwenden wir nun für unsere Versuche ungeteilte Wurzelsysteme (s. Tabelle 15), so nehmen wir damit den Pflanzen mit kalt gehaltenem ganzem Wurzelsystem die Möglichkeit, ihr Wasserdefizit aus einer warmen stickstofffreien Nährlösung zu decken. Das dadurch in der

Tabelle 14. *Geteiltes Wurzelsystem: Entwicklungszustand der Pflanzen am Ende des Versuchs*

A. Hafer 1954

Nährlösung		Frischgewicht in g					Länge der Blattscheiden in cm	Länge des längsten (3.) Blattes in cm	Zahl der Bestockungsausschläge
warm	kalt	Sproß	Wurzel Gesamt	Gesamt	Gewichtszunahme	Gewichtszunahme / Anfangsgewicht			
a) Nährlösungen nicht ausgetauscht									
1 N	0	1,61	1,04	2,65	2,15	4,30	7,2	20,0	$2^1/_4$
0	1 N	1,07	1,03	2,10	1,60	3,20	5,9	17,6	$^1/_2$
b) Nährlösungen periodisch ausgetauscht									
1 N	0	1,43	0,75	2,18	1,64	3,04	6,0	17,3	$2^1/_2$
0	1 N	1,20	0,69	1,89	1,35	2,50	5,8	16,7	$^3/_4$

B. Bohne 1954

Nährlösung		Frischgewicht in g					Sproßlänge in cm
warm	kalt	Sproß	Wurzel Gesamt	Gesamt	Gewichtszunahme	Gewichtszunahme / Anfangsgewicht	
a) Nährlösungen nicht ausgetauscht							
1 N	0	11,54	3,30	14,84	9,72	1,90	64,7
0	1 N	8,28	2,89	11,17	6,34	1,31	53,7
b) Nährlösungen periodisch ausgetauscht							
1 N	0	8,43	1,54	9,97	5,35	1,16	48,3
0	1 N	7,05	0,90	7,95	3,08	0,63	41,7

Tabelle 15. *Ungeteiltes Wurzelsystem: Entwicklungszustand der Pflanzen am Ende des Versuchs*

Hafer 1956

Nährlösung	Temperatur	Frischgewicht in g: Sproß	Wurzel Gesamt	Gesamt	Gewichtszunahme	Gewichtszunahme / Anfangsgewicht	Länge der Blattscheiden in cm: Hauptsproß + Seitensprosse = Gesamt	Zuwachs	Zahl der Bestockungsausschläge	Länge des 4. Blattes in cm	Blattfläche[1] in cm²
1 N	warm	4,15	2,12	6,27	5,41	6,29	20,4 + 1,9 = 22,3	12,8	2	33,3	86
	kalt	1,12	0,46	1,58	0,72	0,84	9,7 + 0,3 = 10,0	1,1	$1^2/_3$	(16,9)[2]	24
1 N + Ca	warm	3,83	1,92	5,75	4,89	5,68	19,6 + 1,5 = 21,1	11,6	2	31,7	83
	kalt	0,94	0,42	1,36	0,52	0,62	9,6 + 0,3 = 9,9	0,8	$1^2/_3$	(12,9)	21
2 N + K	warm	3,99	2,14	6,13	5,26	6,05	19,0 + 2,7 = 21,7	12,2	2	33,2	81
	kalt	1,20	0,49	1,69	0,82	0,94	10,4 + 0,5 = 10,9	1,4	2	(17,8)	27
2 N + Ca	warm	4,17	2,11	6,28	5,43	6,39	20,2 + 1,5 = 21,7	12,7	2	34,2	91
	kalt	1,11	0,47	1,58	0,74	0,88	10,0 + 0,3 = 10,3	1,2	$1^2/_3$	(15,0)	23

Bohne 1955

Nährlösung	Temperatur	Frischgewicht in g: Sproß	Wurzel Gesamt	Gesamt	Gewichtszunahme	Gewichtszunahme / Anfangsgewicht	Sproßlänge in cm: Hauptsproß + Seitensprosse = Gesamt	Zuwachs	Blattfläche in cm²: Primärblätter	Folgeblätter Gesamt	Gesamt
1 N	warm	12,40	3,81	16,21	12,33	3,18	40,4 + 7,3 = 47,7	31,9	159	324	483
	kalt	4,83	0,53	5,36	1,50	0,39	28,8 + 0,7 = 29,5	13,5	131	58	189
1 N + Ca	warm	12,54	4,08	16,62	12,89	3,46	41,2 + 7,3 = 48,5	34,2	167	319	486
	kalt	5,37	0,52	5,89	2,11	0,56	29,4 + 0,9 = 30,3	15,8	133	70	203
2 N + K	warm	11,50	3,39	14,89	11,25	3,09	39,5 + 7,7 = 47,2	31,7	167	265	432
	kalt	5,02	0,53	5,55	1,92	0,53	29,1 + 0,7 = 29,8	14,5	122	60	182
2 N + Ca	warm	11,88	3,86	15,74	11,99	3,20	39,0 + 6,4 = 45,4	30,5	164	274	438
	kalt	5,53	0,52	6,05	2,30	0,61	30,5 + 0,7 = 31,2	16,3	133	74	207

[1] S. Anm. 1 S. 550. — [2] ( ) = noch nicht ausgewachsen.

Pflanze eintretende extreme Wasserdefizit wirkte sich für das Wachstum der Pflanze äußerst schädigend aus und überdeckte die Unterschiede zwischen dem Wachstum in gekühlter Nährlösung von einfachem und doppeltem Stickstoffgehalt weitgehend, hob sie aber nicht völlig auf. Die fördernde Wirkung des doppelten Stickstoffgehalts im kalten Gefäß war bei ungeteiltem Wurzelsystem zwar schwach, aber eindeutig[1]. Die schädigende Wirkung der durch tiefe Temperatur gehemmten Wasser- und Stickstoffaufnahme zeigte sich schon äußerlich: Die Bohnen mit gekühltem Gesamtwurzelsystem stellten zunächst einmal für einige Tage ihre Wasseraufnahme fast völlig ein und welkten bereits, wenn die relative Luftfeuchtigkeit einige Zeit unter 90% sank (Näheres s. Kap. V). Die neu entstehenden kümmerlichen Blätter waren stark chlorotisch (bei einfacher und doppelter Stickstoffmenge) und wurden mit der Zeit sogar z. T. nekrotisch. Die Assimilatableitung in die Wurzeln war stark gehemmt. Dadurch kam es zur Anschwellung der Hypokotylbasis mit beginnender Seitenwurzelbildung. Dieses Ergebnis steht in völliger Übereinstimmung mit GOEBEL 1908, S. 176. Interessant war, daß alle diese Kümmerpflanzen trotz ihres sehr geringen Massenzuwachses wohl entwickelte Blütenknospen ansetzten, in dieser Beziehung also nicht einmal so sehr hinter den bei Versuchsende blühenden Pflanzen mit warm gehaltenem Gesamtwurzelsystem zurückstanden. Natürlich war auch hierin der Unterschied gegenüber den Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem deutlich, denn bei diesen lag der Blühbeginn der Pflanzen mit stickstoffversorgter gekühlter Wurzelhälfte nur 1—2 Tage hinter dem der Pflanzen mit stickstoffversorgter warm gehaltener Wurzelhälfte.

Der Hafer wurde zwar auch stark geschädigt, doch war die neugebildete Blattfläche hier kaum chlorotisch. Die Schäden bestanden in einem allmählichen Absterben und Vertrocknen älterer Blätter von der Spitze her. Immerhin zeigte sich bei einem gleichzeitig mit dem Bohnenversuch durchgeführten Haferversuch, daß hier die Pflanzen mit gekühltem Gesamtwurzelsystem verglichen mit den Pflanzen mit warm gehaltenem Gesamtwurzelsystem weniger geschädigt wurden als bei Bohnen. Beim hier veröffentlichten Haferversuch bewirkte die Dauerbeleuchtung (s. Kap. III) eine Vergrößerung der Differenz zwischen warm- und kalt-Pflanzen, da die Pflanzen ihr normalerweise tagsüber auftretendes Wasserdefizit nachts nicht mehr decken konnten. Trotzdem wählten wir diesen Versuch, weil hier die Parallelen wesentlich einheitlicher waren als beim anderen Versuch.

[1] Sehr interessant in diesem Zusammenhang ist die Entdeckung von SKAZKIN und CVETKOVA (1954), daß die bei unzureichendem Wassergehalt des Bodens im allgemeinen eintretende Verringerung des Körnerertrags der Gerste durch Stickstoffdüngung beseitigt werden kann.

2. *Strukturveränderungen („Xeromorphie")*

Wenn auch die Hemmung des Massenzuwachses bei Stickstoff-kalt im wesentlichen allgemeiner Natur war, so war sie doch mit dem Auftreten xeromorpher Strukturen verbunden. Morphologisch wirkte sich dies in einer Verschiebung des Sproß-Wurzel-Verhältnisses zugunsten der Wurzel aus, anatomisch in einem Ansteigen der Stomata- und Nervaturdichte der Blätter. Daß Stickstoffmangel Xeromorphie bewirkt, stellten schon MOTHES (1932), BURSTRÖM (1934), MÜLLER-STOLL (1947), SIMONIS (1948), SIDERIS und YOUNG (1950), WEISSMAN (1950) u. a. fest.

Tabelle 16. *Geteiltes Wurzelsystem: Xeromorphe Strukturen*

Hafer 1955				Bohne 1955				
Nährlösung		Blatt 4	Sproß	Nährlösung		Blatt 1		Sproß
warm	kalt	Stomatadichte [1,2]	Wurzel	warm	kalt	Stomatadichte [1,3]	Nervaturdichte [1,4]	Wurzel
1N	0	17,9	2,38	1N	0	186,3	44,2	1,88
0	1N	21,2	1,60	0	1N	264,6	50,8	1,25
1N + Ca	0	16,9	2,34	1N + Ca	0	195,6	46,0	1,54
0	1N + Ca	21,6	1,51	0	1N + Ca	271,1	53,8	1,18
2N + K	0	18,7	2,02	2N + K	0	208,0	49,3	1,55
0	2N + K	17,6	2,14	2	2N + K	209,5	46,1	1,54
2N + Ca	0	18,4	2,24	2N + Ca	0	199,3	44,1	1,50
0	2N + Ca	17,6	1,75	0	2N + Ca	197,5	43,9	1,61

[1] Stomatadichte = Zahl der Stomata pro mm² Blattfläche.

Nervaturdichte = Länge der Nerven in cm pro cm² Blattfläche.

Die angegebenen Werte sind, wie auch in den vorhergehenden Tabellen, die Mittelwerte aus 3 Parallelen. Zur Sicherung der Ergebnisse müßten hier eigentlich die ausführlichen Tabellen der Einzelwerte mit genauen Fehlerberechnungen für jedes Blatt gebracht werden, da zur Sicherung geringer Unterschiede bereits die Verschiedenheiten zwischen den Zweiergruppen (s. Kap. II3, S. 527) eine Rolle spielen. Ihre Veröffentlichung ist aber aus Platzmangel nicht möglich, da sie außer der Sicherung nichts Neues bringen. Es sollen deshalb hier als Anhaltspunkte für jede Tabelle nur die durchschnittlichen mittleren Fehler in Form einer Fußnote angegeben werden. Die ausführlichen Tabellen mit genauer Fehlerberechnung können jederzeit im Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Stuttgart-Hohenheim eingesehen werden.

[2] Durchschnittl. mittl. Fehler: ±0,20 bis ±0,26.

[3] Durchschnittl. mittl. Fehler: ±2,67 bis ±3,56.

[4] Durchschnittl. mittl. Fehler: ±0,61 bis ±1,11.

Betrachten wir die erhaltenen Xeromorphiewerte (s. Tabelle 16), so stellen wir fest, daß bei *doppelter Stichstoffmenge-kalt* die Pflanzen *wesentlich mesomorpher* gebaut waren als bei einfacher Stickstoffmenge-kalt. Dies gilt jedoch nur für die Versuche mit geteiltem Wurzelsystem.

Tabelle 17. *Ungeteiltes Wurzelsystem: Xeromorphe Strukturen*

Hafer 1956				Bohne 1955				
Nährlösung	Temperatur	Blatt 3 Stomatadichte [1, 2]	Sproß/Wurzel	Nährlösung	Temperatur	Blatt 1 Stomatadichte [1, 3]	Blatt 1 Nervaturdichte [1, 4]	Sproß/Wurzel
1N	warm	21,3	1,96	1N	warm	121,5	34,5	3,3
	kalt	30,7	2,44		kalt	256,8	53,5	9,1
1N + Ca	warm	19,6	1,99	1N + Ca	warm	116,0	35,6	3,1
	kalt	30,9	2,24		kalt	221,8	48,2	10,3
2N + K	warm	18,9	1,86	2N + K	warm	117,6	32,9	3,4
	kalt	27,5	2,45		kalt	230,9	52,5	9,5
2N + Ca	warm	18,1	1,98	2N + Ca	warm	115,9	32,4	3,1
	kalt	25,6	2,36		kalt	220,4	48,2	10,6

[1] s. Anm, 1, S. 554.
[2] Durchschnittl. mittl. Fehler: $\pm 0{,}23$ bis $\pm 0{,}32$.
[3] Durchschnittl. mittl. Fehler: $\pm 2{,}78$ bis $\pm 3{,}63$.
[4] Durchschnittl. mittl. Fehler: $\pm 0{,}64$ bis $\pm 1{,}12$.

Bei ungeteiltem Wurzelsystem (s. Tabelle 17) wären dem Sproß-Wurzel-Verhältnis nach die kalt gehaltenen Pflanzen wesentlich mesomorpher als die warm gehaltenen. Dies war aber natürlich nur dadurch bedingt, daß das Wurzelwachstum durch tiefe Temperatur äußerst stark gehemmt war. Der Sproß jedoch, der sich bei höherer Temperatur entwickeln konnte, wuchs, wenn auch nur sehr schwach, weiter. Daß in Wirklichkeit die kalt gehaltenen Pflanzen jedoch sehr stark xeromorph waren, beweisen die Stomata- und Nervaturdichte. Auch hierin zeigte sich, daß die kalt gehaltenen Pflanzen mit doppelter Stickstoffmenge fast stets etwas mesomorpher waren als die entsprechenden kalt gehaltenen mit einfacher Stickstoffmenge. Daß die Unterschiede hier nur sehr klein waren (wie auch im Gewicht), war ja zu erwarten.

Nicht ganz sicher ist jedoch das Verhalten der Pflanzen in warmer Nährlösung von doppeltem Stickstoffgehalt gegenüber denen in warmer Nährlösung von einfachem Stickstoffgehalt (s. Tabelle 16 und 17). Das Sproß-Wurzel-Verhältnis deutete zwar durchweg auf eine bei warmer Nährlösung von doppeltem Stickstoffgehalt größere Xeromorphie hin. Auch die Stomata- und Nervaturdichte wiesen bei geteiltem Wurzelsystem eindeutig in dieser Richtung, was ja auch nach dem geringeren Massenzuwachs der warm gehaltenen Pflanzen mit doppelter gegenüber denen mit einfacher Stickstoffmenge im Substrat zu erwarten war. Bei ungeteiltem Wurzelsystem waren jedoch die Verhältnisse gerade umgekehrt.

Noch problematischer ist das Verhältnis des Calciums zur Xeromorphie. Hier läßt sich nichts Sicheres aussagen, denn die einerseits durch Calcium geförderte relative Stickstoffaufnahme und die andererseits

durch Calcium gehemmte Wasseraufnahme wirkten hier in genau entgegengesetzter Richtung, so daß es je nach Überwiegen des einen oder anderen Faktors zu starken Schwankungen der Ergebnisse kam. Zwar sind die Angaben, daß Calcium die Xeromorphie verstärkt, in der Literatur zahlreich (HANSTEEN-CRANNER 1914, KISSER 1927, GRAČANIN 1932b und 1939, BURSTRÖM 1934, 1952 und 1954, AULICH 1936 u. a.), doch arbeiteten diese Autoren meist mit wesentlich größeren Variationsbreiten als mit einfacher und doppelter Menge. Unter diesen Bedingungen soll das Auftreten einer einheitlichen Tendenz absolut nicht bezweifelt werden, bei geringer Calciumdifferenz wird sie jedoch leicht durch andere Faktoren überlagert.

Zu den Versuchen des Jahres 1954 (s. Tabelle 18) wäre zu sagen, daß durch den periodischen Austausch der Nährlösungen trotz der geringen

Tabelle 18. *Geteiltes Wurzelsystem: Xeromorphe Strukturen*

Hafer 1954				Bohne 1954				
Nährlösung		Blatt 3	Sproß/Wurzel	Nährlösung		Blatt 1		Sproß/Wurzel
warm	kalt	Stomatadichte[1, 2]		warm	kalt	Stomatadichte[1, 3]	Nervaturdichte[1, 4]	
a) Nährlösungen nicht ausgetauscht				a) Nährlösungen nicht ausgetauscht				
1N	0	17,0	1,55	1N	0	117,7	47,1	3,50
0	1N	20,1	1,04	0	1N	145,1	56,0	2,86
b) Nährlösungen periodisch ausgetauscht				b) Nährlösungen periodisch ausgetauscht				
1N	0	18,7	1,91	1N	0	133,6	51,0	5,48
0	1N	20,8	1,74	0	1N	167,2	59,4	7,83

[1] Siehe Anm. 1, S. 554.
[2] Durchschnittl. mittl. Fehler: ±0,40 bis ±0,47.
[3] Durchschnittl. mittl. Fehler: ±2,43 bis ±2,57.
[4] Durchschnittl. mittl. Fehler: ±1,02 bis ±1,16.

Gewichtszunahme das Sproß-Wurzel-Verhältnis stieg. Durch die bei jedem Nährlösungsaustausch stattfindende Abkühlung bzw. Erwärmung der Wurzelhälften wurde also das Wurzelsystem stärker geschädigt als das Sproßsystem, was ja nicht wundernimmt. Die Stomata- und Nervaturdichte stieg jedoch ebenfalls. Der Sproß war also in Übereinstimmung zur geringeren Gewichtszunahme xeromorpher. Aus der Reihe fiel der Sproß-Wurzel-Wert der Bohne Stickstoff-kalt-ausgetauscht, welcher zu hoch war[1].

Fragen wir nach der Ursache der Ausbildung xeromorpher Merkmale, so kommen wir zu dem Ergebnis, daß in unserem Falle wohl der Stickstoffmangel die Hauptursache sein dürfte, denn ein Wassermangel

[1] Bei dem Parallelversuch war er, wie normal, tiefer als der entsprechende Stickstoff-warm-Wert.

war ja bei geteiltem Wurzelsystem primär nicht gegeben. Bei ungeteiltem Wurzelsystem wurde jedoch, wie schon erwähnt, das Phänomen durch den gleichzeitig auftretenden Wassermangel verstärkt. Da also auch ohne Wassermangel Xeromorphie auftritt, dürfte die Kausalreihe im wesentlichen so verlaufen: Tiefe Temperatur bewirkt Stickstoffmangel; Stickstoffmangel wirkt sich aber hemmend auf die Blattflächenentwicklung aus; die Folge davon ist Xeromorphie. Die Wirkung des Stickstoffs wäre also hauptsächlich nur indirekter Natur.

Diese Überlegung führt uns auch zu einer allgemeinen kritischen Betrachtung der Xeromorphieerscheinung und des Xeromorphiebegriffs. Sicher dürfte sein, daß die *Xeromorphie* hauptsächlich eine *Sekundärerscheinung* ist, eine Folge irgendeines Mangelzustandes (Wassermangel, Stickstoffmangel, Lichtmangel u. a., Literatur s. Kap. I), der sich auf die Blattflächenentwicklung hemmend auswirkt. Ganz streng darf jedoch diese Regel nicht gefaßt werden, denn Blätter gleicher Größe können unter verschiedenen Bedingungen entstehen, die ihrerseits die anatomische Struktur der Blätter beeinflussen. Diese Verhältnisse trafen wir z. B. auch bei geteiltem Wurzelsystem bei unseren Xeromorphiewerten für doppelten Stickstoffgehalt an, bei denen die Stomata- und Nervaturdichte der Pflanzen mit doppelter Stickstoffmenge im kalten Gefäß trotz etwas kleinerer Blätter niedriger sein konnte als die der Pflanzen mit doppelter Stickstoffmenge im warmen Gefäß. Es zeigte sich jedoch, daß die Entstehung größerer Unterschiede mit einer der obigen Regel entsprechenden Blattflächenveränderung parallel ging. Die Variationsmöglichkeit war also bei etwa gleicher Blattfläche begrenzt. Es erhebt sich hier auch die Frage, ob es nach alledem berechtigt ist, überhaupt noch von einer Xeromorphie zu sprechen, genauer gesagt, ob der Xeromorphiebegriff dem heutigen Stand der Ursachenforschung noch genügt. Sprachlich gesehen ist dies zweifellos nicht der Fall, denn es ist streng genommen völlig abwegig, bei Wasserkultur von einer „Xero"morphie zu sprechen, oder bei Hochmoorpflanzen, oder bei in tiefem Waldesschatten lebenden Kümmerpflanzen, denn die Ursache der Xeromorphie ist hier ja nicht der Wassermangel, sondern Stickstoff-, Licht- oder sonst ein Mangel, ganz abgesehen davon, daß Lundkvist (1955) feststellte, daß auch bei überoptimaler Wasserversorgung Xeromorphosen auftreten können, ebenso wie bei einem Überangebot an Stickstoff (Abolina 1949) bzw. von Nährsalzen allgemein (Sorauer 1880). Man sollte den Begriff der Xeromorphie nur noch für die Fälle anwenden, bei denen die betreffende strukturelle Veränderung primär durch Wassermangel bedingt ist[1]. Man ist dann allerdings gezwungen,

[1] Die beste derzeitige Literaturübersicht findet sich bei Mangum Shields (1950) mit 258 Literaturangaben; erschöpfende kausal-physiologische Betrachtung s. Walter (1926, 1931 und 1951 [Bd. III/1]).

für diese Xeromorphie i. e. S. einen Überbegriff zu schaffen, der alle anderen Ursachen dieser Erscheinung umschließt. Wir schlagen hierfür die Bezeichnung „Peinomorphie" bzw. „Peinomorphosen"[1] vor, abgeleitet von dem griechischen Wort „πεῖνα" = Hunger.

Zum Schluß möge es mir erlaubt sein, Herrn Professor Dr. H. WALTER, Stuttgart-Hohenheim, für die Anregung und stetige Förderung dieser Arbeit meinen besonders herzlichen Dank zu sagen. Für die Anfertigung der Photographien danke ich Herrn Dozent Dr. E. BURCIK.

Zusammenfassung

1. DADYKIN stellte 1950 die Theorie auf, daß die Xeromorphie auf kalten Böden durch Stickstoffmangel bedingt sei. Den Beweis durch Stickstoffanalysen und anatomische Untersuchungen lieferte er jedoch nicht. Die Aufgabe dieser Arbeit war es daher, den Einfluß tiefer Temperatur auf die Wurzelentwicklung, die Wasser- und Stickstoffaufnahme quantitativ zu untersuchen, die Beziehungen zwischen diesen Faktoren aufzuzeigen und ihren Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen, besonders auf das Auftreten xeromorpher Merkmale, nachzuweisen. Es zeigte sich jedoch, daß bei erhöhtem Stickstoffgehalt des Substrats diese ganzen Verhältnisse beträchtlich verschoben werden. Deshalb wurde der ganze Faktorenkomplex mit 2 verschiedenen Stickstoffkonzentrationen (386,7 und 773,4 mg NO_3^-/l) untersucht.

2. Das Wurzelsystem 14 bzw. 16 Tage alter Hafer- und Bohnenpflanzen wurde in zwei möglichst gleiche Hälften geteilt. Die eine kam in eine Nährlösung von etwa Lufttemperatur (meist +15 bis +25° C), die andere in eine solche von 0 bis +2° C (Eiskühlung). Die Stickstoffgabe wurde so verteilt, daß der einen Pflanze der Stickstoff im warmen, der Parallelpflanze der Stickstoff im kalten Gefäß geboten wurde. Daneben wurden noch bei sonst gleicher Versuchsanordnung zur Erzielung eines gleichmäßigen Wurzelsystems die warme und kalte Nährlösung bei einigen Pflanzen alle 3 Tage ausgetauscht. Außerdem führten wir dieselben Versuche mit ungeteiltem Wurzelsystem durch.

3. Der wesentliche Faktor für die Wurzelentwicklung ist nicht der Stickstoffgehalt des Substrats, sondern die Temperatur desselben. Es zeigte sich nämlich, daß im Vergleich mit der durch tiefe Temperatur bewirkten starken Wachstumshemmung der Einfluß des Stickstoffgehalts der Nährlösung auf die Wurzelentwicklung nur gering ist, wenn sich auch bei Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem stets eine leichte Wachstumsförderung im stickstoffhaltigen gegenüber dem stickstofffreien Substrat zeigt.

4. Auch bei geteiltem Wurzelsystem ist die Wasseraufnahme der in gekühlter Nährlösung befindlichen Hälfte gehemmt. Diese Hemmung

[1] Herrn Professor Dr. STEINER-Bonn danke ich für seine Mithilfe bei der Namensfindung.

ist nicht die Folge des geringen Wurzelwachstums. Unabhängig davon ist die Wasseraufnahme zugunsten der jeweils stickstoffhaltigen Seite verschoben. Diese Verschiebung ist im Prinzip unabhängig von der unter 3. angegebenen Verschiebung des Wurzelgewichts. Doppelte Stickstoffmenge im kalten Gefäß bewirkt im Gegensatz zu doppelter Stickstoffmenge im warmen Gefäß eine leichte Steigerung der Wasseraufnahme gegenüber den entsprechenden Parallelen mit einfacher Stickstoffmenge.

5. Die Stickstoffaufnahme ist durch tiefe Temperatur stets stark gehemmt und zwar nicht nur insgesamt, sondern auch bezogen auf die aufgenommene Nährlösungsmenge. Im einzelnen zeigt sich, daß doppelte Stickstoffmenge im kalten Gefäß gegenüber einfacher Stickstoffmenge im kalten Gefäß eine starke Steigerung der Stickstoffaufnahme bewirkt und zwar insgesamt und bezogen auf die aufgenommene Nährlösungsmenge (viel stärker als bei den entsprechenden Stickstoff-warm-Werten).

6. Die Gewichtszunahme der ganzen Pflanze ist bei den Pflanzen mit Stickstoff im kalten Gefäß aus obigen Gründen stets geringer als bei solchen mit Stickstoff im warmen Gefäß. Dabei ist der Unterschied bei Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem wesentlich geringer als bei solchen mit ungeteiltem Wurzelsystem (letztere leiden ja zusätzlich unter stark erschwerter Wasseraufnahme). *Bei stickstoffhaltiger warmer Nährlösung ist für das Wachstum einfache Stickstoffmenge optimal*, doppelte Stickstoffmenge meist bereits nicht mehr optimal; *bei stickstoffhaltiger kalter Nährlösung ist einfache Stickstoffmenge noch nicht optimal.* Bei Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem ist das Wachstum bei doppelter Stickstoffmenge in kalter Nährlösung wesentlich besser als bei einfacher Stickstoffmenge in kalter Nährlösung, bei Pflanzen mit ungeteiltem Wurzelsystem ist der Unterschied wegen des gleichzeitig in der Pflanze auftretenden extremen Wasserdefizits nur noch gering.

7. Als typische Stickstoffmangelerscheinungen treten bei Pflanzen mit Stickstoff im kalten Gefäß parallel zu der oben erwähnten geringeren Gewichtszunahme deutliche „Xeromorphie"-Merkmale auf. Bei geteiltem Wurzelsystem sind die Pflanzen mit kalter Nährlösung von doppeltem Stickstoffgehalt wesentlich mesomorpher als die mit kalter Nährlösung von einfachem Stickstoffgehalt. Bei ungeteiltem Wurzelsystem sind aus obigen Gründen die Unterschiede nur noch gering.

Der Xeromorphiebegriff wurde einer kritischen Betrachtung unterzogen und für die Folgeerscheinungen eines Stickstoffmangels abgelehnt. Es wurde vorgeschlagen, den Begriff der Xeromorphie auf seine ursprüngliche Bedeutung einzuschränken und als übergeordneten Begriff die Bezeichnung „Peinomorphie" einzuführen.

8. Alle erwähnten Erscheinungen traten erwartungsgemäß bei Bohnen schärfer hervor als beim Hafer.

Literatur

ABOLINA, G. I.: Wachstum und Bau der Blätter bei Getreidearten im Zusammenhang mit der Mineralernährung und der Bodenfeuchtigkeit. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **68**, 173—176 (1949) (Russisch). — AMBERGER, A.: Zur Frage des Wasserverbrauchs unter dem Einfluß der Düngung. Z. Acker- u. Pflanzenbau **99**, 45—54 (1955). — AULICH, K.: Beiträge zur Kenntnis der Calcium-Wirkung auf das Keimlings-Wachstum von Weizen. Ber. schweiz. bot. Ges. **45**, 335—371 (1936). — BAUMEISTER, W.: Beiträge zur Mineralstoffernährung der Pflanzen. (Forschungsber. des Wirtschafts- und Verkehrsminist. Nordrhein-Westf. Nr. 137.) Köln u. Opladen 1955. — BĚLEHRÁDEK, J.: Le relatissement des réactions biologiques par le froid est causé par une augmentation de la viscosité du protoplasma. Protoplasma **3**, 317—326 (1928). — BÖHNING, R. H., and B. LUSANARDANA: A comparative study of gradual and abrupt changes in root temperature on water absorption. Plant Physiol. **27**, 475—488 (1952). — BÖTTICHER, R., u. L. BEHLING: Licht, Transpiration, Salzaufnahme und Blattstruktur. Flora (Jena) **134**, 1—44 (1940). — BREWIG, A.: Permeabilitätsänderungen der Wurzelgewebe, die vom Sproß beeinflußt werden. Z. Bot. **31**, 481—540 (1937). — BROUWER, R.: Transpiration and anion uptake. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Ser. C **56**, 639—649 (1953). — Water absorption by roots of Vicia faba at various transpiration strengths. I. Analysis of the uptake and the factors determining it. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Ser. C **56**, 106—115 (1953). — Water absorption by roots of Vicia faba at various transpiration strengths. II. Causal relation between suction tension resistance and uptake. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Ser. C **56**, 129—136 (1953). — Water absorption by roots of Vicia faba at various transpiration strengths. III. Changes in water conductivity artificially obtained. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Ser. C **57**, 68—80 (1954). — The regulating influence of transpiration and suction tension on the water and salt uptake by roots of intact Vicia faba plants. Acta bot. neerl. **3** (2), 264—312 (1954b). — BROYER, T. C., and D. R. HOAGLAND: Metabolic activities of roots and their bearing on the relation of upward movement of salts and water in plants. Amer. J. Bot. **30**, 261—273 (1943). BURSTRÖM, H.: Über antagonistische Erscheinungen bei der Kationenaufnahme des Hafers. Sv. bot. Tidskr. **28**, H. 2, 157 (1934). Zit. nach AULICH 1936. — Studies on growth and metabolism of roots. VIII. Calcium as growth factor. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 391—402 (1952). — Studies on growth and metabolism of roots. X. Investigation of the Calcium effect. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 332—342 (1954). — BUTLER, G. W.: Ion uptake by young wheat plants. II. The "apparent free space" of wheat roots. Physiol. Plantarum (Copenh.) **6**, 617—635 (1953). — DACHNOWSKY: The toxic property of bog-water and bog-soil. Bot. Gaz. **46**. Zit. nach MONTFORT 1918 u. a. — DADYKIN, V. P.: Über den Wasserhaushalt und die Ernährung von Pflanzen auf kalten Böden. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. S. **70**, 1073—1076 (1950a) (Russisch). — Zur Kenntnis der Wurzelsysteme der auf kalten Böden sich entwickelnden Vegetation. Bull. Soc. Naturalistes Moscau, Ser. Biol. **55**, H. 3, 59—69 (1950b) (Russisch). — DIKUSSAR, I. G.: Die Wirkung des Ammoniumsulfats und des Salpeters auf die Entwicklung von Zuckerrübe und Mais in Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung der Nährlösung. Landw. Jb. **72**, 79—104 (1930). — DÖRING, B.: Die Temperaturabhängigkeit der Wasseraufnahme und ihre ökologische Bedeutung. Z. Bot. **28**, 305—383 (1935). — EHRENBERG, P.: Das Kalk-Kali-Gesetz. Berlin 1919. — FIRBAS, F.: Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Hochmoorpflanzen. Jb. wiss. Bot. **74**, 459—696 (1931). — FREELAND, R. O.: Effect of transpiration upon the absorption and distribution of mineral salts in plants. Amer. J. Bot. **23**, 355—362 (1936). —

Effect of transpiration upon the absorption of mineral salts. Amer. J. Bot. **24**, 373—374 (1937). — GASSNER, G., u. W. FRANKE: Der Stickstoffhaushalt junger Weizenpflanzen in seiner Abhängigkeit von der Mineralsalzernährung. Phytopath. Z. **7**, H. 2, 187—222 (1934). — GESSNER, F.: Über die Wasseraufnahme emerser Wasserpflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, H. 9, 340—343 (1954). — GESSNER, F., u. M. SCHUMANN-PETERSEN: Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Pflanzen bei Stickstoffmangel. Z. Naturforschg. **3** b, 36—41 (1948). — GOEBEL, K.: Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen. Leipzig u. Berlin 1908. GRAČANIN, M.: Contribution à l'étude de la relation entre la transpiration et la résorption des ions. C. r. Acad. Sci. Paris **195**, 899—935 (1932a). — Bull. internat. Acad. Yougosl. **26**, 25—31 (1932b). Zit. nach Fortschr. Bot. **4** (1935). — Rev. Sci. Agric. Zagreb **1939**, H. 3/4. Zit. nach Fortschr. Bot. **10** (1941). — GRIGORJEVA, V. G.: Die Lebenstätigkeit der Pflanzenwurzeln in kalten Böden. Priroda **1953**, H. 1, 101—104 (Russisch). — HAAS, A. R. C., and H. S. REED: Relation of desiccating winds to fluctuation in ash content of citrus leaves and phenomenon of mottle-leaf. Bot. Gaz. **83**, 161—172 (1927). — HANSTEEN-CRANNER, B.: Über das Verhalten der Kulturpflanzen zu den Bodensalzen. III. Jb. wiss. Bot. **53**, 536—598 (1914). — HARLEY, I. L.: Soil conditions and the growth of beech seedlings. J. Ecology **37**, 28—37 (1949). — HASSELBRING, H.: The relation between the transpiration stream and the absorption of salts. Bot. Gaz. **57**, 72—73 (1914). — HEYL, J. G.: Der Einfluß von Außenfaktoren auf das Bluten der Pflanzen. Planta (Berl.) **20**, 294—353 (1933). — HOAGLAND, D. R.: Lectures on the inorganic nutrition of plants. Chron. Bot. Comp. Waltham, Mas. (Sec. print) 1948. — HOAGLAND, D. R., and T. C. BROYER: General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods. Plant Physiol. **11**, 471—507 (1936). — Accumulation of salts and permeability in plant cells. J. Gen. Phys. **25**, 865—880 (1942). — HONERT, T. H. VAN DEN: The phosphate absorption by sugar cane. Leiden 1933. — Beperkende factoren bij de phosphaatopname (mit englischer Übersetzung). Leiden 1936. — HONERT, T. H. VAN DEN, J. J. M. HOOYMANS and W. S. VOLKERS: Experiments on the relation between water absorption and mineral uptake by plant roots. Acta bot. neerl. **4**, 139—155 (1955). — HUBER, B.: Transpiration in verschiedener Stammhöhe. I. Sequoia gigantea. Z. Bot. **15**, 465—501 (1923). — Vergleichende Betrachtung der pflanzlichen Saftströme. Naturwiss. **40**, H. 6, 180—185 (1953). — HYLMÖ, B.: Transpiration and ion absorption. Physiol. Plantarum (Copenh.) **6**, 333—405 (1953). — Passive components in the ion absorption of the plant. Physiol. Plantarum (Copenh.) **8**, 433—449 (1955). — JAHNEL, H.: Untersuchungen über die Elektrolytkonzentration des Transpirationsstroms. Jb. wiss. Bot. **86**, 527—555 (1938). — JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Bd. 1. Leipzig u. Dresden 1946. — JUDKINS, W. P., and I. W. WANDLER: Correlation between leaf color, leaf nitrogen content, and growth of apple, peach and grape plants. Plant Physiol. **25**, 78—85 (1950). — KIESSELBACH, T. A.: Transpiration as a factor in crop production. Un. Nebr. Agr. Exper. Stat. Res. Bull. **6**, 170—184 (1916). — KIHLMANN, A. O.: Pflanzenbiologische Studien aus Russisch-Lappland. Acta Soc. Fauna et Flora fenn. **6**. — KISSER, J.: Untersuchungen über den Einfluß der Nährsalze auf die Wasserabgabe, Wasseraufnahme, relative Sproß- und Wurzelmasse und die Blattstruktur. Planta (Berl.) **3**, 562—596 (1927). — KÖHNLEIN, E.: Untersuchungen über die Höhe des Wurzelrindenwiderstandes und die Bedeutung aktiver Wurzeltätigkeit für die Wasserversorgung der Pflanzen. Planta (Berl.) **10**, 381—423 (1930). — KREYZI, R.: Beiträge zur Phosphorsäureaufnahme der Pflanze in Wasserkultur. Z. Pflanzenernährg Düng. u. Bodenk. A **25**, 156—179 (1932). — LONG, E. M.: The effect of salt additions to the substrate on uptake of water and nutriments by roots of approachgrafted tomato plants.

Amer. J. Bot. **30**, 594—601 (1943). — LUNDEGÅRDH, H.: Die Nährstoffaufnahme der Pflanze. Jena 1932. — Investigations as to the absorption and accumulation of inorganic ions. Ann. Agricult. Coll. Sweden **8**, 234—404 (1940). — LUNDEGÅRDH, H., u. H. BURSTRÖM: Untersuchungen über die Salzaufnahme der Pflanzen. III. Quantitative Beziehungen zwischen Atmung und Anionenaufnahme. Biochem. Z. **261**, 235—251 (1933). — LUNDEGÅRDH, H., u. VL. MORAVEK: Untersuchungen über die Salzaufnahme der Pflanzen. Biochem. Z. **151**, 296—309 (1924). — LUNDKVIST, L. O.: Wasserüberschuß und Stickstoffmangel als Ursache gewisser Strukturveränderungen bei Mesophyten. Sv. bot. Tidskr. **49**, H. 3, 387—418 (1955). — MANGUM SHIELDS, L.: Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. Bot. Review **16**, 399—447 (1950). — MARTHALER, H.: Die Stickstoffernährung der Hochmoorpflanzen. Zugleich ein Beitrag zum Xeromorphieproblem. Jb. wiss. Bot. **88**, 723—758 (1939). — MENDIOLA, N. B.: Effect of different rates of transpiration on dry weight and ash content of the tabacco plant. Philippine J. Sci. **20**, 639—655 (1922). — MONTFORT, C.: Die Xeromorphie der Hochmoorpflanzen als Voraussetzung der „physiologischen Trockenheit" der Hochmoore. Z. Bot. **10**, 257—352 (1918). — Die aktive Wurzelsaugung aus Hochmoorwasser im Laboratorium und am Standort und die Frage seiner Giftwirkung. Jb. wiss. Bot. **60**, 184—255 (1921). — Die Wasserbilanz in Nährlösung, Salzlösung und Hochmoorwasser. Beiträge zu einer vergleichenden Ökologie der Moor- und Salzpflanzen. Z. Bot. **14**, 97—172 (1922). — MOROZOV, P. V.: Über den Einfluß der Bodentemperatur auf das Wachstum des Wurzelsystems des Sommerweizens in der Periode zwischen Aussaat und Keimung. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. S. **76**, 293—294 (1950) (Russisch). — MOTHES, K.: Ernährung, Struktur und Transpiration. Ein Beitrag zur kausalen Analyse der Xeromorphosen. Biol. Zbl. **52**, 193—223 (1932). — MÜLLER-STOLL, W.: Der Einfluß der Ernährung auf die Xeromorphie der Hochmoorpflanzen. Planta (Berl.) **35**, 225—251 (1947). — MUENSCHER, W. C.: The effect of transpiration on the absorption by plants. Amer. J. Bot. **9**, 311—330 (1922). — NEARPASS, D. CH., and M. DROSDORFF: Potassium, calcium, and magnesium in tung leaves as related to these ions in the soil. Soil Sci. **74**, 295—300 (1952). — NĚMEC, A.: Über die Wirkung einer Stickstoffdüngung junger Fichten auf die Nährstoffaufnahme der Nadeln in Abhängigkeit von der Bodenreaktion und von dem Nährstoffhaushalt des Bodens. Bodenkde u. Pflanzenernährg **17**, 204—235 (1940). — NICKOLAY, W.: Aufnahme von Ammon- und Nitratstickstoff durch Keimlinge. Inaug.-Diss. Bonn 1941. — NILSSON, H.: Einiges über die Biologie der schwedischen Sumpfpflanzen. Bot. Zbl. **76**, 9—14 (1898). — PARKER, F. W., and E. TROUG: The relation between the calcium and nitrogen content of plants and the function of calcium. Soil Sci. **10**, 49—56 (1920). — PEKAREK, J.: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. VI. Mitteilung: Der Einfluß der Temperatur auf die Zellsaftviskosität. Protoplasma **20**, 251—278 (1933). — PETRISCHEK, K.: Über die Beziehungen zwischen Geschwindigkeit und Elektrolytgehalt des aufsteigenden Saftstromes. Flora (Jena) **140**, 345—385 (1953). — PFEILSTICKER, K.: Die colorimetrische Nitratbestimmung mit Diphenylamin oder Diphenylbenzidin. Z. anal. Chem. **89**, 1—8 (1932). — PHILLIS, E., and T. G. MASON: The effect of ringing and transpiration on mineral uptake. Ann. of Bot., N. S. **4**, 645—650 (1940). — SACHS, J.: Das Erfrieren bei Temperaturen über 0°. Bot. Ztg. **18**, 123—126 (1860). — SCHIMPER, A. F. W.: Pflanzengeographie auf physiologischer Grundlage, 1. Aufl. Jena 1898. — SCHMID, K.: Über die Geschwindigkeit der N-Aufnahme landwirtschaftlicher Kulturpflanzen aus Ammon- und Nitratsalzen. Inaug.-Diss. Landwirtsch. Hochschule Hohenheim 1930. — SCHMIDT, O.: Die Mineralstoffaufnahme der höheren Pflanze als Funktion einer Wechselbeziehung zwischen inneren und äußeren Faktoren.

Z. Bot. **30**, 289—334 (1936). — SCHROPP, W.: Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Unterrichtsmethodik. Der Vegetationsversuch. 1. Die Methodik der Wasserkultur höherer Pflanzen. Radebeul u. Berlin 1951. — SHERWOOD, F. W., J. O. HALVERSON, W. W. WOODHOUSE and F. H. SMITH: Effect of fertilisation on nitrogen, calcium, and phosphorus content of pasture herbage. J. Amer. Soc. Agron. **39**, 841—858 (1947). — SIDERIS, C. P., and H. Y. YOUNG: Growth of Ananas comosus (L.) Merr. at different levels of mineral nutrition under greenhouse and field conditions. I. Plant and fruit weights and absorption of nitrate and potassium at different growth intervals. Plant Physiol. **25**, 594—616 (1950). — SIMONIS, W.: CO_2-Assimilation und Xeromorphie von Hochmoorpflanzen in Abhängigkeit vom Wasser- und Stickstoffgehalt des Bodens. Biol. Zbl. **67**, 77—83 (1948). — SKAZKIN, F. D., i N. N. CVETKOVA: Der Einfluß von Stickstoff auf Gerste bei Wassermangel im Boden während der verschiedenen Entwicklungsstadien der Gerste. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. S. **97**, 539—542 (1954) (Russisch). SØRENSEN, TH.: Temperature relations and phenology of the northeast Greenland flowering plants. Medd. Grønland **125**, Nr. 9 (1941). — SORAUER, P.: Studien über Verdunstung. Forschgn Gebiet Agrikultur-Physik **3**, 351—490 (1880). — STOCKER, O.: Transpiration und Wassergehalt in verschiedenen Klimazonen. I. Untersuchungen an der arktischen Baumgrenze in Schwedisch-Lappland. Jb. wiss. Bot. **75**, 494—549 (1932). — WAHHAB, A., and Z. H. SHAH: Effect of liming on the absorption of calcium, phosphorus and nitrogen by sorghum plant in alkaline soil. Agronomy J. **44**, 621—624 (1952). — WALTER, H.: Die Anpassung der Pflanzen an Wassermangel. Das Xeromorphieproblem in kausal-physiologischer Betrachtung. Naturwiss. u. Landw. **1926**, H. 9. — Die Hydratur der Pflanze und ihre physiologisch-ökologische Bedeutung. Jena 1931. — Grundlagen des Pflanzenlebens, 3. Aufl. Stuttgart 1950. — Grundlagen der Pflanzenverbreitung, Teil 1: Standortslehre. Stuttgart 1951. — WEBER, F., u. H. HOHENEGGER: Reversible Viskositätserhöhung des Protoplasmas bei Kälte. Ber. dtsch. bot. Ges. **41**, 198—204 (1923). — WEISSMAN, G. S.: Growth and nitrogen absorption of wheat seedlings as influenced by the ammonium: nitrate ratio and the hydrogen-ion concentration. Amer. J. Bot. **37**, 725—738 (1950). — WIENHUES, W.: Über die Aufnahme von Ammonium- und Nitratstickstoff bei Roggenkeimlingen. Inaug.-Diss. Bonn 1941.— WOLF, W.: Die SAUSSUREschen Gesetze der Aufsaugung von einfachen Salzlösungen durch die Wurzeln der Pflanzen. Landw. Versuchsstat. **6**, 203—230 (1864). — WRIGHT, K. E.: Transpiration and the absorption of mineral salts. Plant. Physiol. **14**, 171—174 (1939). — ZURBICKIJ, Z. I., i D. V. STRAUSBERG: Der Einfluß der Temperatur auf die Phosphor- und Calciumaufnahme durch die Pflanze. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. S. **96**, 1065—1067 (1954) (Russisch).

Dr. H. GREB, Stuttgart-Hohenheim,
Botanisches Inst. d. Landw. Hochschule

Planta, Bd. 48, S. 564—577 (1957)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

ÜBER DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE BEI CYPERACEEN

I. DER BAU DES VEGETATIVEN VEGETATIONSKEGELS UND DIE ANFANGSSTADIEN DER BLATTENTWICKLUNG

Von

CHARLOTTE THIELKE

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. November 1956)

A. Einleitung

Bei vielen Monocotylen scheint die Aktivität der Epidermis für die Ausgestaltung vegetativer Organe eine weit größere Rolle zu spielen, als man es bei dicotylen Pflanzen zu sehen gewohnt ist. Davon geben mehrere Berichte über das Vorkommen von epidermalen Hautsäumen an Blatträndern und epidermalen Mesophyllbildungen bei Periklinalchimären Zeugnis (RENNER 1936, RENNER und VOSS 1942, THIELKE 1948a, b u.a.). Die gesamte zweischichtige Blattlamina von *Elodea densa* und *E. canadensis* entsteht mit Ausnahme des mehrschichtigen Mittelnerven allein aus der Oberhaut (HERRIG 1913, STANT 1952). Auch an der Bildung der Ligula ist bei sehr vielen Formen die Epidermis vorwiegend beteiligt. Die Strukturanalysen der Knospen einiger Gramineen (RÖSLER, 1928, KLIEM 1936, SHARMAN 1945, THIELKE 1951 u.a.) haben zudem gezeigt, daß die meisten Vertreter dieser Familie, soweit sie untersucht sind, sich durch eine besondere Aktivität des „Dermatogens" auszeichnen. So kommt es häufig zur Hervorwölbung einer jungen Blattanlage allein durch die Tätigkeit der Oberhaut. Es können sogar vollständige Blätter nur aus der äußeren Tunicaschicht hervorgehen. Auch bei älteren Blättern läßt sich diese Aktivität der äußeren Zellage daran erkennen, daß die später entstehende Ligula rein epidermaler Herkunft ist, und daß im Bereiche des Unterblattrandes während der ganzen Wachstumsperiode ein epidermales Randmeristem tätig ist.

Es lag daher nahe, an Pflanzen aus benachbarten Verwandtschaftskreisen zu prüfen, ob sich dort auch entsprechende Vorgänge aufzeigen lassen. Vor allem schien es wissenswert, ob ähnliche Beobachtungen auch an den systematisch nahestehenden Cyperaceen gemacht werden können. Daß hier die Möglichkeit einer weitergehenden epidermalen Differenzierung vorhanden ist, geht aus der Arbeit HABERLANDTS (1879) hervor, in der berichtet wird, daß während der späteren Blattdifferenzierung Sklerenchymfasern bei *Cyperus*-Arten sowohl epidermal als auch subepidermal entstehen können. (Eigene ergänzende Beobachtungen sollen dazu im zweiten Teil dieses Berichtes mitgeteilt werden.)

Ein weiterer Grund, Untersuchungen über den Bau der Vegetationskegel einiger Cyperaceen gesondert darzustellen, liegt in der Tatsache, daß der einzige bisher in der Literatur vorliegende Bericht über den Bau des Scheitels einer Cyperacee Verhältnisse zeigt, die nicht für die ganze Familie verallgemeinert werden dürfen. STANT (1952) schildert bei *Carex hordeistichos* einen Vegetationskegel mit einschichtiger Tunica. Tunica- und Corpusinitialen fallen durch besonders schwach gefärbte, d.h. plasmaarme Zellen auf und zeigen damit, daß eine cytologische Differenzierung im Sinne FOSTERS (1938) vorliegt. Nach ihrer Angabe (S. 117) sei aber bei drei anderen Arten der gleichen Gattung, die nicht näher bezeichnet werden, eine Variabilität in der Zahl der Tunicaschichten festzustellen.

Im folgenden soll der Bau einiger Cyperaceen-Vegetationskegel beschrieben werden. Bei der Darstellung der Blattentwicklung erfahren nur die frühen Stadien eine Berücksichtigung. Das Hauptinteresse soll dabei dem Verhalten der äußeren Tunicaschicht gelten, insbesondere der Frage, ob sich in ihr auch eine Teilungstätigkeit in perikliner Richtung feststellen läßt, wie sie bei Gräsern sehr verbreitet ist. In diesem Zusammenhang ist es wieder wichtig, zu prüfen, aus welchen Schichten sich die Ligula herleitet, und wie das Randwachstum bei Ober- und Unterblatt vonstatten geht. Dabei werden nur solche Längsschnitte ausgewertet, bei denen die Blattprimordien median getroffen sind. Bei der im vegetativen Bereich der hier untersuchten Pflanzen herrschenden dreizeiligen Blattstellung muß bei richtiger Schnittführung jedes dritte Blattprimordium median geschnitten werden.

Die hier berichteten Ergebnisse wurden aus der Untersuchung von je etwa 40 Vegetationskegeln jeder Art gewonnen. Fixiert wurde im Chromessigsäure-Formalin-Gemisch nach BELLING. Nur bei *Cyperus papyrus*, der bei einer botanischen Exkursion des Pflanzenphysiologischen Institutes unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. DRAWERT nach Sizilien am Anapo bei Syracus gesammelt wurde, kam ein Propionsäure-Formalin-Alkohol-Gemisch zur Anwendung, das wegen seines hohen Alkoholgehaltes im Gelände bequemer zu handhaben war.

B. Hauptteil

1. Carex acutiformis EHRH. Der vegetative Vegetationskegel ist hier von einer konstant zweischichtigen Tunica überzogen (Abb. 1a, b). Während die Zellen der äußeren Lage ziemlich flach und etwas tangential gedehnt erscheinen, sind die der zweiten Schicht palisadenartig steil gestellt. Besonders große und plasmaarme Zellen, die Initialen von Tunica und Corpus bei *Carex hordeistichos* (STANT 1952) kennzeichnen sollen, sind hier nicht zu finden. Die oberen Zellen des gesamten Vegetationskegels sind gleichmäßig plasmareich. Die ersten Teilungen zu Beginn einer Blattanlage werden im Bereich der zukünftigen Blattmedianen in der zweiten Tunicaschicht sichtbar. Die äußere Zellage

nimmt an der Ausbildung des Laubblattes zunächst nicht teil. Nur selten ist einmal in der Spitze eines Primordiums eine periklin eingezogene Zellwand innerhalb der Epidermis zu sehen; an der Blattspitze eines bereits über den Vegetationskegel erhobenen Blattes kann es dagegen zu kleinen epidermalen Gewebekuppen kommen. Daß sich das Corpus auch an der Blattbildung beteiligt, ist nicht sehr wahrscheinlich,

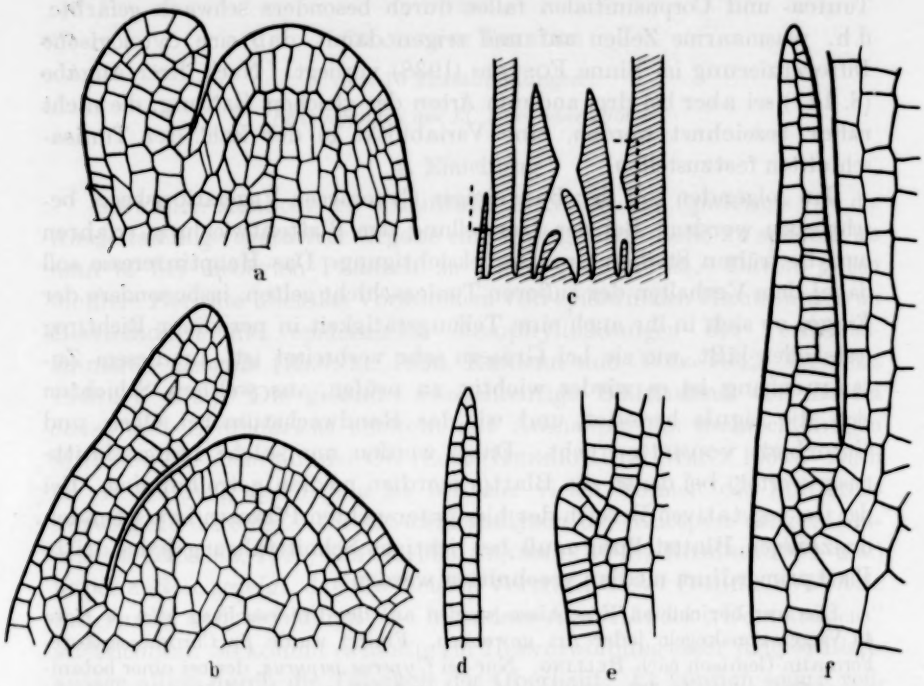


Abb. 1a—f. *Carex acutiformis*. a, b Vegetationskegel mit Blattanlagen im medianen Längsschnitt, 400 ×. c Knospe im Längsschnitt, Übersicht, 60 ×. d Zweischichtige Scheide im Längsschnitt, 400 ×. Siehe linke Markierung in Abb. 1c. e Beginn der Ligulaentwicklung, 400 ×. Siehe rechte Markierung in Abb. 1c. f Ältere, epidermal entstandene Ligula, 400 ×

konnte aber nicht mit Sicherheit entschieden werden. Wenn die Blattanlage die Höhe des Vegetationskegels erreicht hat, setzt die Tätigkeit eines subepidermalen Ventralmeristems ein, und es entsteht dadurch eine kleinere Vorwölbung, die den Raum des über den Scheitel etwas geneigten jungen Blattes ausfüllt.

Die Anlegung eines Blattes, das eine geschlossene Scheide besitzt, geschieht nach Art eines schrägen Ringwulstes, der sich in der Medianen stark überhöht. Die der Medianen gegenüberliegende Seite der Blattanlage tritt erst sehr viel später in Erscheinung (Abb. 1 c, d). Und hier findet von Beginn an eine Teilungstätigkeit der Epidermis statt, die durch Segmentierung der Spitzenzelle abwechselnd nach innen und nach

außen für die Entstehung des zweischichtigen Scheidenteils sorgt, der der Blattanlagenmedianen gegenüberliegt und am fertigen Blatt etwa bis zur Höhe der Ligula reicht. Die erste Anlage der Ligula ist erst an relativ alten Blättern sichtbar (Abb. 1c, e). In der subepidermalen Zellschicht werden perikline Zellwände eingezogen, so daß durch eine schwache Vorwölbung der Ort, an dem die Ligula entsteht, schon markiert ist, wenn in der Epidermis die ersten Teilungen auftreten. Wie bei den meisten Gräsern, so bleibt auch hier die Ligula rein epidermaler Herkunft. Das läßt sich noch in etwas älterem Zustand erkennen (Abb. 1f). Subepidermales Gewebe tritt, wenigstens bei den untersuchten Stadien, nicht in den Ligularzapfen mit ein. Auffällig ist, daß das Dickerwerden der anfangs zweischichtigen Ligula dadurch erfolgt, daß perikline Zellteilungen nur innerhalb der gegen die Blattlamina hin gerichteten Zellage erfolgen. Die innere Epidermis bleibt weiterhin einschichtig.

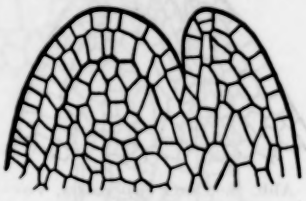


Abb. 2. *Carex vulpina*, Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×

2. Carex vulpina L. Hier finden sich am Scheitel fast die gleichen Verhältnisse wie bei *C. acutiformis*. Eine zweischichtige Tunica überzieht den recht kleinen Vegetationskegel (Abb. 2). Die zweite Lage hat wieder etwas steiler gestellte Zellen. Von einer cytologischen Differenzierung des Gewebes innerhalb der Tunica und des Corpus ist nichts zu erkennen. Die Blattanlagen leiten sich im wesentlichen aus Derivaten der zweiten Tunicaschicht her. Die erste Zellage bleibt praktisch unaufgespalten, doch findet sich in ihr öfter eine periklin eingezogene Zellwand an der Primordialspitze des Blattes. Zu größeren epidermalen Gewebekuppen kommt es dann allerdings nicht mehr. Bei etwas älteren Blättern, etwa vom 3.—4. Blatt an, erhebt sich gegenüber der Blattanlagenmedianen der Scheidenwulst, der sein Wachstum mit Hilfe einer Kante von Scheitelzellen beginnt, deren abwechselnd nach innen und nach außen abgegebene Tochterzellen die zweischichtige Scheidenflanke aufbauen. Bei solchen Blättern, die eben erst die Anlage der Scheidenseite zeigen, kommt es im Bereich des zukünftigen Oberblattes auf der adaxialen Seite oft zu einer Vergrößerung und zur radialen Streckung von Epidermiszellen, und etwa gleichzeitig setzt eine Teilung in perikliner Richtung ein. Die Tochterzellen dieser epidermalen Spaltung bleiben recht plasmaarm und liefern eine lokal begrenzte mehrschichtige Oberhaut im Sinne Pfitzers (Linsbauer 1930). Die Ligula entsteht ebenfalls rein epidermal, kommt aber noch etwas später zur Ausbildung als bei *C. acutiformis*, so daß ältere Stadien entsprechend Abb. 1f in den zugeschnittenen Knospenstücken nicht enthalten waren.

3. Carex cyperoides L. Der Bau dieses Vegetationskegels unterscheidet sich kaum von den vorher besprochenen. Ebenso wie bei *C. acutiformis* u.a. sind die Zellen der zweiten Tunicaschicht palisadenartig steil gestellt (Abb. 3). Das Mesophyll des Blattes stammt aus eben dieser Schichte. Die Oberhaut ist nur selten an der Spitze eines Blattprimordiums periklin gespalten. Der der Blattanlagenmedianen gegenübergelegene Scheidenteil ist wieder rein epidermaler Herkunft. Die Ligula entsteht ebenfalls nur aus der Oberhaut. Sie besteht auch in etwas älterem Zustande nur aus zwei Zellschichten. Die für *C. vulpina* beschriebene perikline Aufspaltung der Oberhaut auf der Ventralseite der jungen Blattanlage findet bei dieser Art nicht statt.

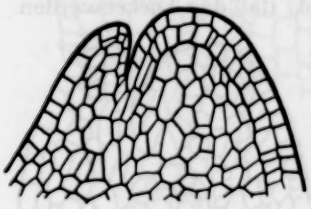


Abb. 3. *Carex cyperoides*, Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×

4. Carex arenaria L. Wie bei den früher geschilderten Formen ist auch hier eine zweischichtige Tunica vorhanden (Abb. 4a). Der Vegetationskegel ist recht klein. Eine cytologische Differenzierung scheint zu fehlen. Das Mesophyll der Blätter leitet sich wieder von der zweiten Tunicaschicht her, die wiederum recht steil gestellt ist. Perikline Teilungen in der Epidermis an der Spitze einer jungen Blattanlage konnten nicht beobachtet werden. Doch kommt es bei etwas älteren Blättern, deren Querschnitt im Bereich des Oberblattes fast dreieckig wird, zu periklinen Teilungen in der Epidermis auf der Mitte der adaxialen Seite. Ähnliche Vorgänge sind schon bei *C. vulpina* angedeutet, hier sind sie aber weit auffälliger (Abb. 4c). Die Epidermiszellen der Innenseite vergrößern sich an dieser Stelle gegenüber denen der Außenseite und denen des Mesophylls sehr auffällig und führen einige unregelmäßig perikline und schräge Teilungen durch. Die Tochterzellen sind ebenfalls gegenüber denen des Mesophylls stark vergrößert. Auf diese Weise kommt es auf der Mitte der Innenseite zu einem epidermalen Gewebestreifen aus vergrößerten Zellen. Die Ligula entsteht vorwiegend epidermal, bei etwas älteren Stadien ist allerdings auch eine rege Teilungstätigkeit der subepidermalen Schichte zu beobachten, deren Derivate sehr wahrscheinlich in die basale Ligula eintreten. Sie verlängert sich ebenfalls durch die Tätigkeit einer Art Scheitelkante. Die Mehrschichtigkeit wird jedoch anfangs anders als bei *C. acutiformis* durch Teilungen der Oberhaut auf beiden Seiten erlangt (Abb. 4e). Später bildet sich aber die Kante zweischneidig segmentierender Zellen, und die Differenzierung geht in ganz ähnlicher Weise vonstatten, d.h. das Mehrschichtigwerden der Ligula geschieht allein durch Teilungen in der abaxial gerichteten Epidermis.

5. Carex flacca SCHREB. Bei *Carex flacca* liegt ebenfalls ein Vegetationskegel mit zweischichtiger Tunica vor, an dem die jungen Blatt-

anlagen sich durch Aufspalten der zweiten Zellschicht hervorzuwölben beginnen (Abb. 5). Die Oberhaut läßt zwar vereinzelte perikline Teilungen erkennen, bildet anfangs jedoch kein Mesophyll. Auch später bleibt die epidermale Teilungstätigkeit, die hier wie bei *C. vulpina* und bei *C. arenaria* auf der Ventralseite von Blättern einsetzt, die den Vege-

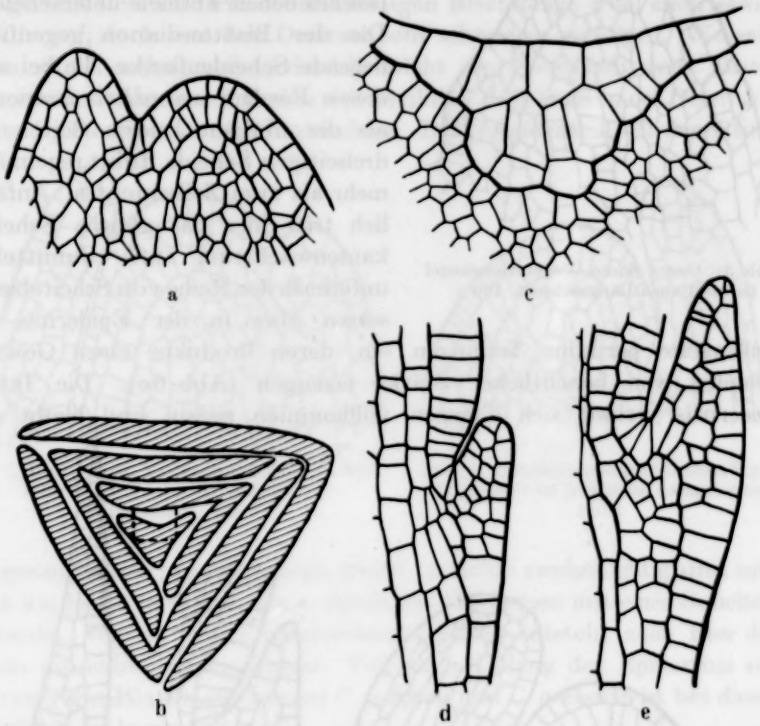


Abb. 4a—e. *Carex arenaria*. a Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×. b Knospe im Querschnitt, etwa 300 μ oberhalb des Vegetationskegels, 30 ×. c Perikline Teilungen in der Oberhaut auf der adaxialen Seite des jüngsten Blattes aus Abb. 4 b, 400 ×. d Epidermale Entstehung der Ligula, 400 ×. e Etwas ältere Ligula, subepidermales Gewebe tritt in die Basis der Ligula ein, 400 ×

tationskegel bereits ein wenig überragen, nur von geringem Ausmaß. Die Ligula geht wieder allein aus der Oberhaut hervor, und auch die zweischichtige Scheidenflanke entsteht, wie es für *C. acutiformis* geschildert wurde, mit Hilfe einer Kante von Scheitelzellen. Eine Differenzierung in cytologischer Hinsicht konnte nicht aufgezeigt werden.

6. Carex disticha Huds. Hier finden sich die gleichen histologischen Verhältnisse in der vegetativen Knospe, wie sie von den meisten anderen *Carex*-Arten bekannt geworden sind (Abb. 6a). Eine cytologische Differenzierung konnte nicht festgestellt werden. An einem mit zweischichtiger Tunica versehenen Vegetationskegel entsteht das Mesophyll

im wesentlichen aus der zweiten Zellage. Vereinzelte perikline Zellteilungen in der Oberhaut, wie sie bei anderen Arten ab und zu vorkommen können, sind nicht beobachtet worden. Eine Tatsache aber läßt diese Art von allen anderen jetzt beschriebenen Formen unterscheiden. Die der Blattmedianen gegenüberliegende Scheidenflanke, die bei allen diesen Formen wesentlich dünner ist als die übrigen beiden Seiten der dreiseitigen Scheide, führt regelmäßig mehr als zwei Zellschichten. Anfänglich tritt hier das gleiche Scheitelkantenwachstum auf. Unmittelbar unterhalb der Reihe von Scheitelzellen setzen aber in der Epidermis der Außenseite perikline Teilungen ein, deren Produkte einen Gewebekomplex von beachtlicher Stärke erzeugen (Abb. 6c). Die Innenepidermis verhält sich dagegen vollkommen passiv und bleibt ein-

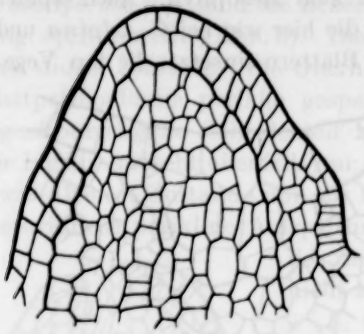


Abb. 5. *Carex flacca*, Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×

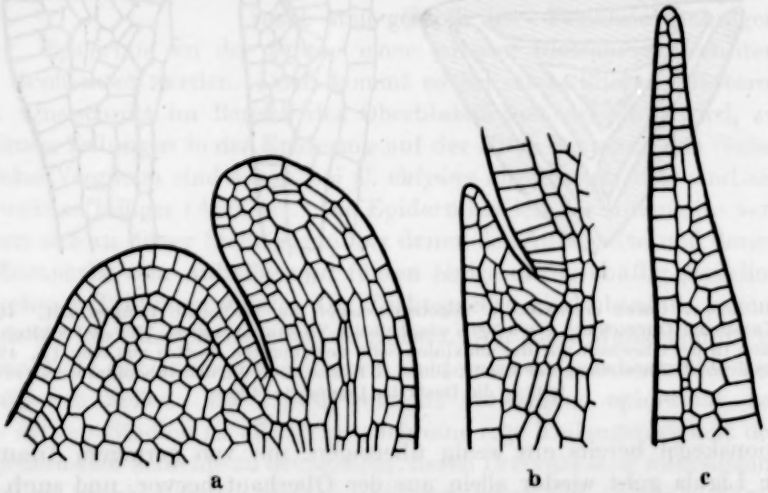


Abb. 6a—c. *Carex disticha*. a Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×. b Epidermale Entstehung der Ligula, 400 ×. c Bildung einer mehrschichtigen Scheidenflanke. Links Innen-, rechts Außenepidermis, 400 ×

schichtig. Die Vielschichtigkeit dieser Scheidenflanke ist also allein durch die Tätigkeit der Außenepidermis entstanden. Am erwachsenen Laubblatt finden wir eine von den sonst üblichen farblosen, häutigen Gebilden abweichende derbe, Chlorophyll führende Scheide. Auch diese Form verfügt über eine epidermal entstandene Ligula (Abb. 6b).

7. Carex flava L. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Arten ist bei *Carex flava* der vegetative Vegetationskegel von einer konstant dreischichtigen Tunica überzogen (Abb. 7). Ebenso wie bei den anderen *Carex*-Arten wird jedoch das Mesophyll einer jungen Blattanlage in seiner Hauptmasse aus der zweiten Tunicaschicht gebildet. Die dritte Zellage teilt sich am Orte der zukünftigen Blattanlage wohl auch etwas periklin auf, doch sind ihre Derivate sehr schwer zu verfolgen. Wesentlichen Anteil nehmen sie jedenfalls nicht am Entstehen eines Blattprimordiums. Vereinzelt finden sich perikline Zellwände in der Oberhaut an der Spitze einer jungen Blattanlage. Der Scheidenteil, der der Blatt-

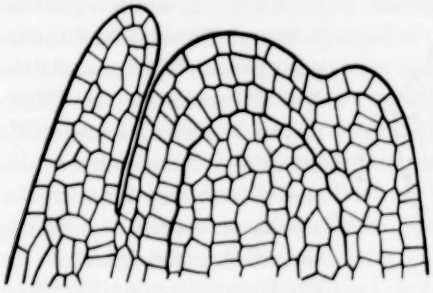


Abb. 7. *Carex flava*, Vegetationskegel mit dreischichtiger Tunica im medianen Längsschnitt, 400 ×

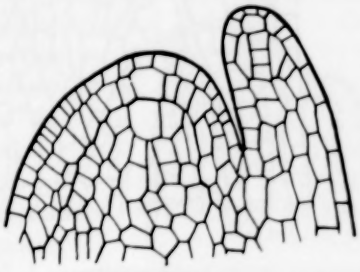


Abb. 8. *Eriophorum angustifolium*, Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×

anlagenmedianen gegenüberliegt, bleibt zunächst zweischichtig und entsteht wie bei *C. acutiformis* u.a. durch das Wachstum mit einer Scheitelzellkante. Wie in früher beschriebenen Fällen entsteht auch hier die Ligula ausschließlich epidermal. Von einer Teilung der Epidermis auf der ventralen Blattfläche wie bei *C. vulpina* und *C. arenaria* ist bei dieser Art nichts zu bemerken.

8. Eriophorum angustifolium Honck. Der Vegetationskegel von *Eriophorum* unterscheidet sich praktisch nicht von denen der meisten *Carex*-Arten mit zweischichtiger Tunica (Abb. 8). Am Orte der zukünftigen Blattanlage erscheinen in der äußeren Tunicaschicht zuerst häufigere Teilungen in antikliner Richtung und in der zweiten Zellage kommt es, wie üblich, zur periklinen Aufspaltung. Nur sehr vereinzelt finden sich an der Spitze von jungen Blattanlagen perikline Aufteilungen in der Oberhaut, die aber keine größeren epidermalen Gewebekuppen verursachen. Der der Blattanlagenmedianen gegenüberliegende Scheidensaum entsteht wieder wie bei den *Carex*-Arten durch die Tätigkeit einer Kante von Scheitelzellen. Die Ligula ist wiederum epidermaler Herkunft.

9. Cyperus alternifolius L. Auch von Vertretern dieser Gattung lagen bisher keine Berichte über den Bau des Vegetationskegels vor. Bei

Cyperus alternifolius ist im vegetativen Bereich nichts von einer cytologischen Differenzierung zu sehen. Alle Zellen des Vegetationskegels erscheinen bei Anwendung der eingangs erwähnten Methodik plasmareich, d.h. stark gefärbt. Der Scheitel und die jungen Blattanlagen werden von einer einschichtigen Tunica überzogen (Abb. 9a). Nur vereinzelt finden sich perikline Teilungen in der äußeren Tunicaschicht über ganz jungen Blattprimordien. Die Hauptmasse des Mesophylls wird aus Corpusgewebe gebildet. An Blättern, die etwas über den Scheitel hinausragen, setzt regelmäßig eine Teilungstätigkeit in der Epidermis der adaxialen Seite ein, die sich auch an älteren Blättern noch nachweisen läßt (Abb. 9b, c). Sie entspricht den Teilungsvorgängen, die wir bei verschiedenen *Carex*-Arten gefunden haben, setzt aber schon in etwas früheren Stadien ein und erreicht auch ein größeres Ausmaß. An Querschnittsserien lassen sich diese Teilungen auch noch an relativ alten Blättern finden, stets am gleichen Ort auf der Mitte der Innenepidermis.

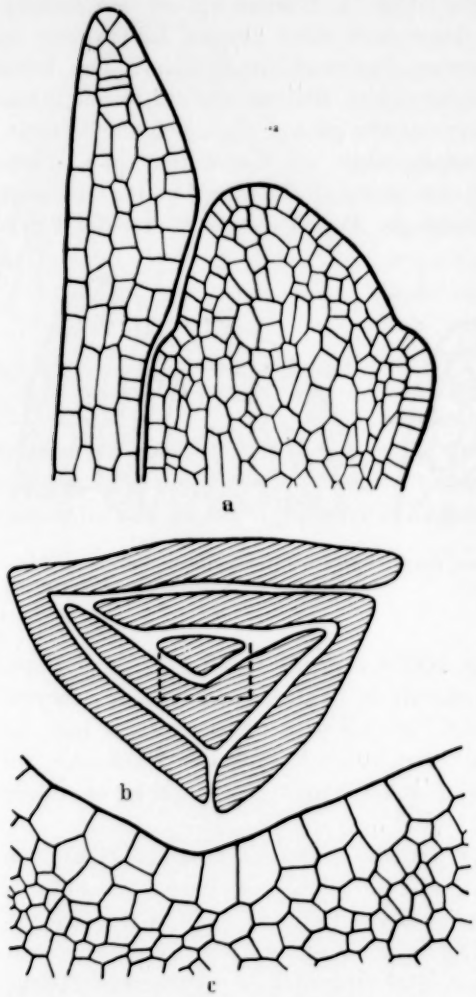


Abb. 9a—c. *Cyperus alternifolius*. a Vegetationskegel und junges Blatt im medianen Längsschnitt, 400 ×. b Knospe im Querschnitt, etwa 140 μ oberhalb des Vegetationskegels, 75 ×. c Perikline Teilungen in der adaxialen Epidermis des in Abb. 9b markierten Blattes

Bei *Cyperus rotundus* L. scheinen ähnliche Teilungen vorzukommen. EAMES (1949) zeigt in Abb. 30, S. 582 in einem Längsschnitt, der in der Nähe des Scheitels durch die Knospe geführt worden ist, junge Blätter, von denen das jüngste auf der linken Seite eine deutlich mehrschichtige Epidermis auf der Oberseite besitzt.

Am Blattrand gibt es kein epidermales Randmeristem und dementsprechend auch keinen zweischichtigen Hautsaum, wie es bei den *Carex*-Arten der Fall ist. Die nur bei den Niederblättern auftretende geschlossene Blattscheide ist auch auf der Schmalseite immer mehrschichtig. Eine Ligula ist ebenfalls nicht vorhanden.

10. Cyperus papyrus L. Im Gegensatz zu *Cyperus alternifolius* ist bei dem vegetativen Vegetationskegel von *Cyperus papyrus* eine zweischichtige Tunica vorhanden (Abb. 10). Auch bei dieser stattlichen Pflanze unterscheidet sich der Scheitel nicht hinsichtlich seiner Größe von dem der bisher behandelten Cyperaceen. Die Epidermis bleibt anfangs unaufgespalten, nur manchmal findet sich am Gipfel einer jungen Blattanlage eine perikline Teilung. Auch bei etwas älteren Blättern sind solche Zellteilungen an der Blattspitze nachzuweisen. Wie üblich, entsteht die Hauptmasse des Mesophylls aus der zweiten Zellage, die wieder etwas steil gestellte Zellen besitzt. Auf der gesamten adaxialen Blattfläche gibt es eine epidermale Aufspaltung, die der entspricht, die für *Cyperus alternifolius* und einige *Carex*-Arten geschildert wurde. Hier ist sie aber viel auffälliger und umfaßt einen weit größeren Bezirk. Die gleichen epidermalen Gewebekomplexe waren regelmäßig auch auf der Ventralfläche der Hochblätter der zukünftigen Inflorescenzen zu finden. Die Scheiden der Niederblätter sind auf der der Medianen gegenüberliegenden Seite nur zweischichtig und entstehen daher ebenfalls epidermal. Eine Ligula wird nicht ausgebildet.

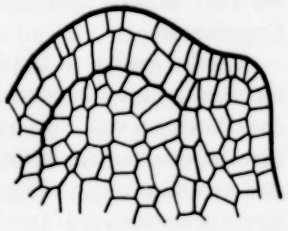


Abb. 10. *Cyperus papyrus*, Vegetationskegel im medianen Längsschnitt, 400 ×

C. Diskussion der Ergebnisse

Bei vergleichender Betrachtung der oben dargestellten histologischen Tatsachen ergeben sich einige Aspekte, die im Hinblick auf das von den Gramineen bekannte von Interesse sein könnten. Alle hier untersuchten Cyperaceen haben einen Vegetationskegel mit einer echten Tunica. Diese Tunica kann ein-, zwei- oder dreischichtig sein. Die Zahl der Schichten des vegetativen Scheitels hat daher keinen Wert zur Charakterisierung dieser taxonomischen Einheit. Alle drei gefundenen Strukturtypen kommen allein innerhalb der Gattung *Carex* vor. Auch die beiden untersuchten *Cyperus*-Arten sind unterschiedlich gebaut. Ebenso verschieden verläuft die Entwicklung der Blätter. Gemeinsam für alle ist die Tatsache, daß die Hauptmasse des Mesophylls aus der subepidermalen Schicht hervorgeht. Bei Formen mit einschichtiger Tunica ist es das Corpus, bei solchen mit zwei oder drei Mantellagen ist es die zweite Tunicaschicht. Man sieht daraus, daß die rein topographisch

festgelegten Strukturelemente des Vegetationskegels keinerlei histogenetischen Wert besitzen.

Die Differenzierung nach cytologischen Merkmalen im Sinne FOSTERs, die neuerdings so oft beschrieben wird, und die auch STANT unter anderem bei *Carex hordeistichos* gefunden hat, konnte bei den untersuchten Arten nirgends beobachtet werden. Vielleicht können sich diese Unterschiede im Plasma- und Vacuolenanteil bei Pflanzen mit solchen wenigzelligen Vegetationskegeln gar nicht einstellen, wie das schon für einige Commelinaceen vermutet wurde (THIELKE 1954). Es wäre jedenfalls denkbar, daß bei einem großen und vielzelligen Scheitel eher eine Arbeitsteilung innerhalb des meristematischen Gewebekomplexes einsetzt als bei den relativ kleinen und wenigzelligen Scheiteln der untersuchten Cyperaceen.

Weiter muß man bei der Darstellung von cytologischen Unterschieden innerhalb eines Meristems bedenken, daß diese Strukturen teilweise das Produkt von Fixierung und Färbung sind. Bei gleicher Methodik können an verschiedenen Pflanzen, sogar an verschiedenen Arten der gleichen Gattung, völlig differente Tinktionsbilder entstehen. Bei den hier verwendeten Hämatoxylin-Färbungen wird jedes Präparat zuerst überfärbt. In der nachfolgenden Differenzierung mit Salzsäure oder mit Alaun zeigt sich dann, daß von den entsprechenden Strukturelementen der Farbstoff bei verschiedenen Pflanzen in sehr unterschiedlicher, für die betreffende Art wahrscheinlich spezifischer Weise festgehalten wird. Bei gründlicher Prüfung ließe sich vielleicht eine Methodik finden, bei der Organelle der verschiedenen Arten allein an ihrem Verhalten den Farbstoffen gegenüber zu identifizieren wären. Einer Gram-Färbung vergleichbar wird der Farbstoff in sehr unterschiedlicher Weise von den idiotypisch verschiedenen Plasmen und Zellwänden festgehalten, nur daß es hier zu graduell differenten Färbungen kommt, während bei der Gram-Färbung ausschließlich die Alternative zwischen gefärbt und ungefärbt zur Frage steht. Tatsache ist, daß die Verteilung des Farbstoffes, die der Intensität nach der Reihe: Kern-Cytoplasma-Zellwand folgt, bei Anwendung gleicher Methodik bei einer anderen Art der gleichen Gattung in der Reihe: Kern-Zellwand-Cytoplasma auftreten kann. Es muß also einmal damit gerechnet werden, daß ein Kennzeichen wie „plasmaarme Zellen" nicht notwendig am gleichen Objekt unter Anwendung anderer Fixierung oder anderer Färbung zutage treten muß. Es könnte bei dem einen Verfahren nur das Plasma nicht gefärbt oder bei der Differenzierung schneller entfärbt werden als bei einem anderen. Andererseits wäre es auch möglich, daß eine fehlende cytologische Differenzierung, die ja nur am fixierten und gefärbten Objekt wahrnehmbar ist, bei Anwendung einer anderen Methode doch sichtbar gemacht werden könnte. Wenn eine solche cytologische Markierung in den Meristemen

unserer Pflanzen nicht gefunden wurde, dann bleibt noch die Möglichkeit offen, daß man sie nach einer anderen Vorbehandlung doch sichtbar machen könnte. Die protoplasmatische Pflanzenanatomie hat am lebenden Objekt große Erfolge erzielt und bereits das Vorhandensein einer Gewebeschichtung (Histosystasie) aufzeigen können. Solange das meristematische Gewebe der Knospe vital schwer zugänglich bleibt, ist es sicher nützlich, den fixierten Zuständen mehr Aufmerksamkeit zu schenken; vielleicht wird es einmal möglich sein, derartige Unterschiede mehr als bisher an fixiertem Material zu zeigen. Diese Fragen seien in diesem Zusammenhang nur angedeutet, sie sollten methodisch einmal genauer bearbeitet und gesondert dargestellt werden.

Die Neigung der Oberhaut, sich periklin aufzuteilen ist bei den geprüften Cyperaceen viel weniger ausgeprägt als bei den meisten Gramineen. Der Hauptimpuls zur Anlegung eines Blattes geht von subepidermalem Gewebe aus. Die Epidermis hat am gleichen Ort meist nur eine vermehrte Teilungstätigkeit in antikliner Richtung. Bei jungen Blattanlagen kann man auf dem Gipfel perikline Zellwände innerhalb der Oberhaut antreffen. Sie sind jedoch nicht sehr häufig und deshalb kaum wesentlich an der Blattbildung beteiligt. Dagegen findet sich als rein epidermale Bildung der nur zweischichtige Scheidenteil, der der Blattanlagenmedianen gegenüberliegt. Die Scheide ist bei *Carex* und *Eriophorum* geschlossen. Der freie Rand ist hier nur auf die obere Kante beschränkt. Trotzdem haben wir die gleiche histologische Eigentümlichkeit, d. h. das gleiche Randwachstum, wie es für Gramineen und andere Monocotylen mit offener Scheide beschrieben wurde (Thielke 1948 b, 1951). Während dort allein im Querschnittsbild an der Ausgestaltung des Blattrandes, ob mit oder ohne zweischichtigen Hautsaum, zu erkennen war, ob es sich um den Bereich des Ober- oder um den des Unterblattes handelt, lassen sich hier die Scheidenränder nur im Längsschnittbild deutlich erfassen. In der früheren Darstellung konnte gezeigt werden, daß bei solchen Pflanzen, die zu epidermaler Spaltungstätigkeit neigen, ein zweischichtiger Hautsaum nur im Bereich des Unterblattrandes auftritt und den oberen Abschluß in der Ligula findet. Bei den *Carex*-Arten und bei *Eriophorum* haben wir ebenfalls im Bereich des Oberblattes niemals zweischichtige Hautsäume, und die zweischichtige Scheidenkante findet ebenfalls ihre direkte Fortsetzung und Begrenzung in der Ligula, die ihrerseits wieder das gleiche Randmeristem besitzt und sich auch durch die Tätigkeit einer Reihe von Scheitelzellen verlängert. Wie die dünne Scheidenflanke, so ist auch die Ligula eine rein epidermale Bildung. Im Gegensatz zur Scheide der meisten *Carex*-Arten wird die Ligula jedoch bald unterhalb der Scheitelkante dadurch mehrschichtig, daß allein die nach außen, d. h. zur Fläche des Oberblattes hin gerichtete Epidermis perikline Teilungen durchführt. In

gleicher Weise wurde auch die Mehrschichtigkeit der Scheide von *Carex disticha* erreicht.

Obwohl das Randwachstum mit Scheitelkante niemals im Bereich oberhalb der Ligula zu finden ist, gibt es bei mehreren Formen weitere perikline Teilungen innerhalb der Oberhaut auf der adaxialen Fläche des Blattes. Diese Teilungen finden zuerst statt zu einer Zeit, in der die Ligula noch nicht markiert ist. Der Ort ihres Erscheinens läßt jedoch vermuten, daß es sich um einen Bezirk oberhalb der zukünftigen Ligula handelt. In manchen Fällen sind diese Teilungen auch noch an älteren Blättern, unmittelbar oberhalb der Insertionsstelle der Ligula kenntlich. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich um die gleichen Zellkomplexe handelt, die HOLM in seinen anatomischen Studien an Cyperaceen als „bulliform-cells" beschrieben hat (1897, 1899). Diese blasenförmigen Zellen befinden sich stets auf der Oberseite des Blattes und sollen — Gelenkzellen vergleichbar — das Kollabieren der Blattlamina ermöglichen. Bei vielen *Carex*-Arten werden sie nur einschichtig ausgebildet, bei anderen, z.B. bei *C. trinervis* werden sie mehrschichtig (HOLM 1897, S. 124 u. Fig. 6: „the bulliform-cells are especially developed and are even supported by several strata of similar, but smaller cells, all constituting a typic closing-apparatus for the leaf-blade"). Eine mehrschichtige Epidermis wird auch für *Fimbristylis complanata*, *F. puberula*, *F. thermalis* und *F. castanea* beschrieben. *Fimbristylis spadicea* hat dagegen nur stellenweise eine mehrschichtige Epidermis (HOLM 1899 b). Die gleichen Vorgänge scheinen auch in der Gattung *Lipocarpha* stattzufinden. Mehrschichtigkeit gibt es in der Oberepidermis von *L. maculata* und *L. argentea*, während *L. microcephala* und *sphacelata* nur einschichtige Epidermen aufweisen (HOLM 1899 a).

Von den hier untersuchten Arten ist diese Teilungstätigkeit gar nicht vorhanden bei *Carex acutiformis*, *C. cyperoides*, *C. disticha*, *C. flava* und *Eriophorum angustifolium*. Nur angedeutet ist sie zu finden bei *Carex vulpina* und *C. flacca*, auffälliger bei *C. arenaria*. Auch bei den beiden *Cyperus*-Arten, die an ihren Laubblättern keine Ligula ausbilden, sind diese Teilungen anzutreffen. Sie sind weit häufiger und liefern einen Gewebekomplex von erheblich größeren Ausmaßen als bei den *Carex*-Arten. Ebenso wie bei den von HOLM bearbeiteten Objekten finden sich in dieser Hinsicht Abstufungen, die bereits während der Entwicklung sichtbar werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Gliederung des Vegetationskegels ist — topographisch betrachtet — bei den geprüften Cyperaceen recht unterschiedlich. Eine einschichtige Tunica haben *Carex hordeistichos* (nach STANT 1952) und *Cyperus alternifolius*. Vegetationskegel mit zweischichtiger Tunica

finden sich bei *Carex acutiformis*, *C. vulpina*, *C. cyperoides*, *C. arenaria*, *C. flacca*, *C. disticha*, *Eriophorum angustifolium* und *Cyperus papyrus*. Nur *Carex flava* besitzt eine dreischichtige Tunica am Scheitel.

2. Die Beteiligung der äußeren Tunicaschicht an der Blattbildung ist im Vergleich zu den entsprechenden Vorgängen bei Gramineen viel geringer. Perikline Zellteilungen in der Oberhaut finden sich nur vereinzelt an der Spitze von jungen Blattanlagen und nur bei manchen Arten später etwas häufiger auf der adaxialen Fläche der Blattlamina. Die Hauptmasse des Mesophylls entsteht subepidermal.

3. Bei Arten mit geschlossener Scheide und Ligula stehen Scheidenrand und Ligula in direkter Verbindung miteinander. An beiden Orten ist ein epidermales Randmeristem tätig.

Literatur

EAMES, A. J.: Comparative effects of spray treatments with growth regulating substances on the nut grass, Cyperus rotundus L., and anatomical modifications following treatment with butyl 2,4-dichlorphenoxyacetate. Amer. J. Bot. **36**, 571—584 (1949). — FOSTER, A. S.: Structure and growth of the shoot apex in Ginkgo biloba. Bull. Torrey Bot. Club **65**, 531 (1938). — HABERLANDT, G.: Entwicklungsgeschichte des mechanischen Gewebesystems der Pflanzen. Leipzig 1879. — HERRIG, F.: Beiträge zur Blattentwicklung einiger phanerogamer Pflanzen. Flora (Jena) **107**, 327 (1913). — HOLM, TH.: Studies in the Cyperaceae. III. Carex Fraseri Andrews, a morphological and anatomical study. Amer. J. Sci. **3**, 121 (1897). — Studies in the Cyperaceae. IX. The genus Lipocarpha R. Br. Amer. J. Sci. **7**, 171 (1899a). — Studies in the Cyperaceae. X. Fimbristylis Vahl; an anatomical treatise of North American species. Amer. J. Sci. **7**, 435 (1899b). — KLIEM, F.: Vegetationspunkt und Blattanlage bei Avena sativa. Beitr. Biol. Pflanz. **24**, 281 (1936). — LINSBAUER, K.: Die Epidermis. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. IV, Abt. 1, Teil 2, Berlin 1930. — RENNER, O.: Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter und reingrüner Blätter. Flora (Jena) **130**, 454 (1936). — RENNER, O., u. M. VOSS: Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter Formen von Prunus, Pelargonium, Veronica, Dracaena. Flora (Jena) **135**, 356 (1942). — RÖSLER, P.: Histologische Studien am Vegetationspunkt von Triticum vulgare. Planta (Berl.) **5**, 28 (1928). — SHARMAN, B. C.: Leaf and bud initiation in the Gramineae. Bot. Gaz. **106**, 269 (1945). — STANT, M. Y.: The shoot apex of some Monocotyledons. Ann. of Bot., N. S. **16**, 115 (1952). — THIELKE, CH.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und zur Physiologie panaschierter Blätter. Planta (Berl.) **36**, 2 (1948a). — Beiträge zur Entwicklungsgeschichte unifazialer Blätter. Planta (Berl.) **36**, 154 (1948b). — Über die Möglichkeiten der Periklinalchimärenbildung bei Gräsern. Planta (Berl.) **39**, 402 (1951). — Die histologische Struktur des Sproßvegetationskegels einiger Commelinaceen unter Berücksichtigung panaschierter Formen. Planta (Berl.) **44**, 18 (1954).

Priv.-Doz. Dr. CHARLOTTE THIELKE, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 1—3, Pflanzenphysiologisches Institut der Freien Universität

Planta, Bd. 48, S. 578—586 (1957)

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn

KALLOSEBILDUNG IN PLASMOLYSIERTEN ALLIUM CEPA-EPIDERMEN

(II. Mitteilung über Kallose)

Von

WALTER ESCHRICH

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Oktober 1956.)

Einleitung

Als Fortsetzung meiner Untersuchungen über Kallose (vgl. ESCHRICH 1954) soll auf eine Art der Kallosebildung aufmerksam gemacht werden, die als Reaktion der lebenden Zelle auf einen experimentellen Eingriff aufzufassen ist. Zugleich bietet sich hierbei die Möglichkeit, die Geschwindigkeit der Kallosebildung zu verfolgen.

Material und Methode

Als Versuchsobjekt diente die innere (obere) Epidermis der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* L. (Handelsware verschiedener Herkunft). Die Epidermishäutchen wurden nach STRUGGER (1947, S. 7) präpariert. Während des Versuchs schwammen sie auf den Versuchslösungen. Die Lösungen wurden mit analysenreinen oder mit reinsten erhältlichen Substanzen der Firma Merck, Darmstadt, in aqua dest. angesetzt. Vor der mikroskopischen Untersuchung wurde etwa 10 ml der jeweiligen Versuchslösung 1 Tropfen konzentrierte Resorcinblaulösung (ESCHRICH 1957) zugesetzt. Die Färbezeit betrug 1—2 Minuten. Die alkalische Anilinblaulösung (CURRIER und STRUGGER 1956) wurde ohne Zusatz von Saccharose in gleicher Weise benutzt.

Untersuchungsergebnisse

Läßt man Stücke der inneren Epidermis von *Allium cepa*-Zwiebelschuppen längere Zeit auf einer hypertonischen Zuckerlösung schwimmen, so bildet ein großer Teil der Zellprotoplasten an der Oberfläche eine Kalloseschicht aus.

Der Nachweis der Kallose erfolgte mit Resorcinblau und alkalischer Anilinblaulösung. Fixiert man die plasmolysierten Epidermisstücke in isotonischen alkoholhaltigen Fixiergemischen, so bleibt die Kallose erhalten. Sie ist unlöslich in Cuoxam (Kupferoxydammoniak), heißem Wasser, verdünnter Salzsäure und Eisessig. In 3%iger KOH wird sie nach 2—24 Std gelöst. Im Polarisationsmikroskop zeigt sie keine Doppelbrechung.

Für wertvolle Hinweise bin ich meinem Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. M. STEINER, sowie Herrn Dr. P. LAMBERTZ (Bonn) zu größtem Dank verpflichtet.

Es wurden verschiedene Saccharide benutzt:

Tabelle 1. *Plasmolyse mit Sacchariden*

Art des Zuckers	Molarität	pH-Wert	Dauer der Plasmolyse bis zur Kallosereaktion in Std
d-Glucose puriss.	0,5	7,4	2,5
d-Glucose puriss.	0,7	7,4	4,5
l-Fructose puriss.	0,7	6,9	1,5[1]
d-Galaktose puriss.	0,7	7,5	8
d-Mannit Erg.Bd.VI	0,5	7,6	15
d-Mannit Erg.Bd.VI	1,0	7,6	13
Saccharose puriss.	0,55	7,4	2,5
Saccharose puriss.	0,9	7,4	4
Lactose DAB VI	0,5	7,4	4,5
Inulin puriss.	heiß gesättigt		24

[1] Fructose war braun verfärbt.

Grundsätzlich scheint jede Zuckerart imstande zu sein, Kallosebildung hervorzurufen. Auch Glycerin-Wasser-Gemische (1:5,6 und 1:7,3) bewirken eine Kallosebildung nach 18 Std; 1 mol Harnstofflösung löste dagegen keine Kallosebildung aus.

Der plasmolysierte Protoplast scheint die zelleigenen Zuckerreserven beim Aufbau der Kallosehülle zu verwenden. Das ergibt sich insbesondere daraus, daß auch bei Plasmolyse mit Lactose Kallosebildung hervorgerufen wird, obgleich dieses Disaccharid schwerlich von der Zelle gespalten werden dürfte.

Es ist zweifelhaft, ob die in Tabelle 1 verzeichneten unterschiedlichen Zeitabstände von Beginn der Plasmolyse bis zur Kallosebildung reell sind. Ein Vergleich zwischen 0,5 mol Glucose und 0,5 mol Saccharose, beide in doppelt destilliertem Wasser angesetzt, ergab keinen Unterschied in der Zeit der Kallosebildung (jeweils 2,5 Std). Andererseits muß jedoch hervorgehoben werden, daß vielleicht geringste Verunreinigungen des Plasmolytikums, z. B. leichte Karamelisierung meines Fructosepräparates, die Bildung der Kallose erheblich beschleunigen können. Einen gewissen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Kallosebildung scheinen auch die Tageszeit und die Witterung beim Versuchsbeginn geltend zu machen, jedoch lassen sich darüber, wie auch über den Einfluß des p_H-Wertes der Versuchslösungen, noch keine Aussagen machen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigt folgende Stadien der Kallosebildung: Bei Plasmolyse mit 0,9 mol Saccharose hat sich der Protoplast nach einigen Minuten konvex abgerundet. Nach 50 Minuten führen einige Tüpfel Kallosepolster, die sich mit Resorcinblau deutlich anfärben lassen. Einige Zeit später ist die Tüpfelkallosebildung stärker geworden;

vor allem sind es die mit dem Plasmolytikum in Kontakt stehenden Basalwände der Epidermis, die oft mit blauen (gefärbten) Tüpfelarealen übersät sind (Abb. 1). Nach 3—5 Std bemerkt man in einigen

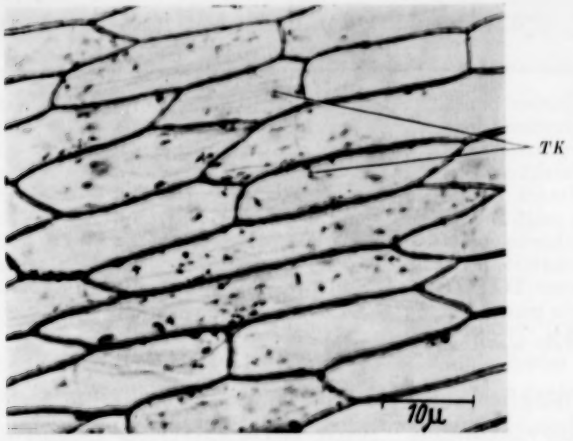


Abb. 1. Tüpfelkalli (*TK*) in der Basalwand der Epidermis. Das Präparat schwimmt auf 0,5 mol Saccharoselösung. Kallose mit Resorcinblau gefärbt

Zellen, daß sich die beiden Pole des kontrahierten Protoplasten mit einem bläulichen Schimmer umgeben haben. Die Intensität der Blaufärbung nimmt rasch zu, so daß nach etwa 8 Std zahlreiche Protoplasten von einer dichten Kalloseschicht umrandet sind (Abb. 2).

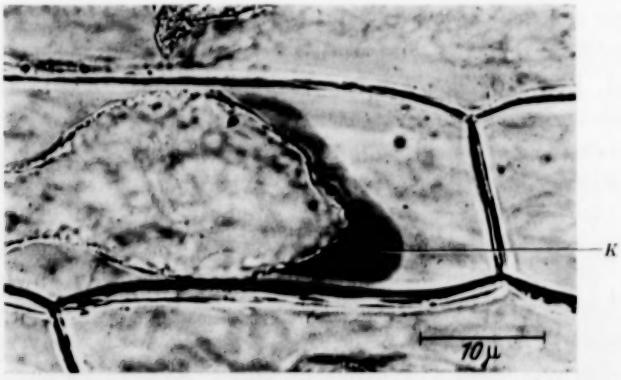


Abb. 2. Dicke Kallosekappe (*K*) nach 32stündiger Plasmolyse in 0,9 mol Saccharoselösung. Resorcinblaufärbung

Bei Anwendung von 0,55 mol Saccharose-Lösung heben sich die Protoplasten gerade eben an den Zellpolen von den Wänden ab. Häufig kann man noch Reste der aus den Tüpfeln herausgerissenen Plasmastränge als Narben oder warzenartige Gebilde an der Plasmaoberfläche oder in den

Tüpfeln beobachten. Hierbei tritt die erste Kallose nach etwa 4 Std immer in der Umgebung dieser Abrißstellen auf. Oft sind die Plasmareste in den Tüpfeln von einer dichten Kallosehülle eingeschlossen (Abb. 3). An der Plasmaoberfläche bedecken sich zuerst die Narben mit Kallose, später verbreitert sich diese zu einer zusammenhängenden Schicht, die jedoch nur an der freien, von der Zellwand losgelösten Protoplastenoberfläche sichtbar wird. Die primären Kallosebildungen treten dann noch deutlich hervor (Abb. 4). Auf der Innenseite der Narben sammeln sich große Mengen von Sphärosomen an; das Plasma scheint dort eine stärkere Strömung als an den übrigen Stellen des Protoplasten zu zeigen.

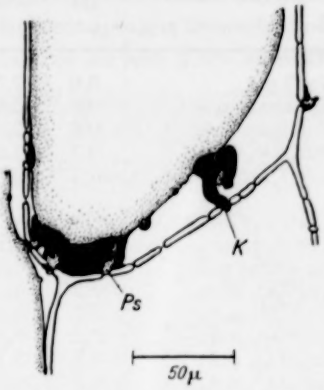


Abb. 3. Plasmolyse in 0,5 mol Glucoselösung. Die Plasmastränge (*Ps*) sind abgerissen und haben sich nach 9 Std mit dicken Kallosehüllen (*K*) umgeben. Kallose: schwarz

Bei der Behandlung mit isotonischer, etwa 0,5 mol Glucoselösung tritt nur Tüpfelkallose auf.

Bei Verwendung von Salzlösungen als Plasmolytika wurden folgende Ergebnisse erhalten: Anorganische und organische Salze mit einwertigen Kationen, wie etwa Na- und K-Salze riefen in keinem Falle Kallose-

Abb. 4. Plasmolyse in 0,7 mol Fructoselösung: An einzelnen Stellen der Protoplastenoberfläche, den Abrißstellen einzelner Plasmastränge, haben sich nach 18 Std dicke Kallosebeläge (*K*) gebildet. Resorcinblaufärbung

bildung hervor. Desgleichen konnte mit Al-Salzen keine Kallosebildung beobachtet werden. Ca-Salze und in schwächerem Maße auch Sr-Salze verursachten oft nach kurzer Zeit schon eine Reaktion des Protoplasten. Die dabei gebildete Kallose unterschied sich jedoch — abgesehen von der Tüpfelkallose — durch ihre flüssige Konsistenz von der durch Zucker hervorgerufenen relativ festen Kallosehülle (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Untersucht wurden die Wirkungen folgender Salzlösungen:*

Art des Salzes	Molarität	pH-Wert	Dauer der Einwirkung Std	Plasmolyse	Kallose gebildet nach Std	Bemerkungen
NaCl p.A.	0,6	7,5	48	+	—	
Na-acetat p.A.	0,3	7,8	45	+	—	
Na-citrat p.A.	0,3	7,6	19	+	—	Zellen tot
KNO_3 p.A.	0,3	7,5	34	+	—	
KNO_3 p.A.	0,2	7,5	34	Grenzplasmolyse	—	
K_2HPO_4 Erg.Bd.VI	0,3	8,7	46	+	—	
KSCN p.A.	0,6	7,1	48	+	—	
Mg-acetat p.A.	0,3	7,4	88	+	52	Kallose sehr selten
$Al(NO_3)_3$ krist.	0,2	4,0	24	+	—	Zellen tot
$Sr(NO_3)_2$ p.A.	0,3	6,3	18	+	18	
$Sr(NO_3)_2$ p.A.	0,2	6,3	12	+	12	
$Ca(NO_3)_2$ p.A.	0,3	6,3	4	+	4	
$Ca(NO_3)_2$ p.A.	0,2	6,3	7	+	7	
$Ca(NO_3)_2$ p.A.	0,15	6,3	5	Grenzplasmolyse	5	Tüpfelkallose
$Ca(NO_3)_2$ p.A.	0,1	6,3	6	—	5	Tüpfelkallose
$CaCl_2$ p.A.	0,3	6,3	16	+	16	
$CaCl_2$ p.A.	0,2	6,3	12	+	12	
$CaCl_2$ p.A.	0,1	6,3	12	—	12	Tüpfelkallose
CaJ_2 Erg. Bd. VI	0,3	8,3	20	+	20	

Schwermetallsalze wurden nicht untersucht.

Offensichtlich spielt das Ca^{++}-Ion eine besondere Rolle bei der Bildung des Kallosesols im Plasmolysevorhof. Vermischt man eine 0,2 mol $Ca(NO_3)_2$-Lösung mit isotonischer KNO_3-Lösung im Verhältnis K : Ca = 9 : 1, so kann man in einzelnen Zellen bereits eine schwache Kallosebildung erkennen. Bei der Zusammensetzung K : Ca = 5 : 5 steigert sich die Zahl kalloseführender Zellen; bei K : Ca = 1 : 9 ist praktisch das gleiche Ergebnis wie mit Ca allein zu verzeichnen, fast jede Zelle hat Kallose gebildet. — Verwendet man $Ca(NO_3)_2$ in grenzplasmolytischer Konzentration, z. B. 0,1 molare Lösung, so treten nach 24stündiger Behandlung in vielen Zellen zarte, gewundene Kallosefäden auf, die stets von einem Tüpfel ausgehen und selten die Breite von 2 μ über-

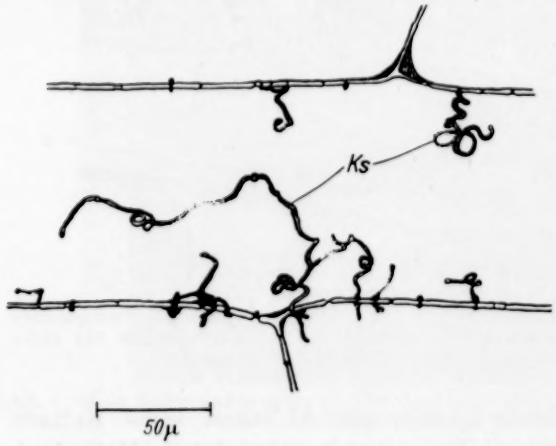


Abb. 5. Bildung von Kalloseschläuchen (*Ks*) nach 28stündiger Behandlung mit 0,1 mol $Ca(NO_3)_2$-Lösung. Kallose: schwarz

schreiten. Bei starker Vergrößerung erkennt man, daß es sich um Schläuche handeln muß, deren Wandung aus Kallose besteht. Die Spitze eines jeden Schlauches enthält ein ungefärbtes, stark lichtbrechendes Körnchen. Diese Schläuche bilden Schleifen und Spiralen, die im Protoplasma liegen und oft beträchtliche Länge erreichen, jedoch nie in eine andere Zelle hinüberwechseln (Abb. 5). Offenbar handelt es sich hier um eine Erscheinung, die mit dem Tüpfelkallus in enger Beziehung steht, aber nur bei Anwendung annähernd isotonischer Ca-Salzlösungen auftritt. Zuckerlösungen zeigten niemals diesen Effekt. Überträgt man die 24 Std lang mit 0,1 mol $Ca(NO_3)_2$ behandelten Häutchen in 0,3 mol $Ca(NO_3)_2$-Lösung, so werden nur diejenigen Zellen plasmolysiert, welche keine Kalloseschläuche gebildet hatten, bzw. der Protoplast zieht sich nur an den Zellenden zusammen, wo keine Schläuche vorhanden waren.

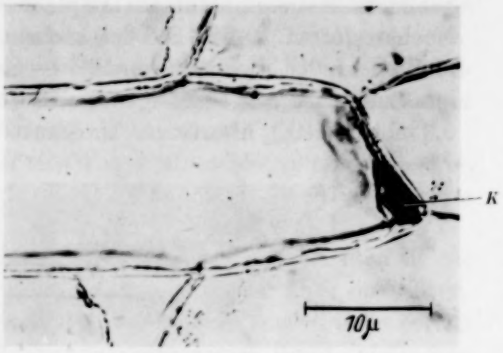


Abb. 6. Plasmolyse mit 0,55 mol Saccharoselösung. Nach 7 Std ist der Plasmolysevorhof mit Kallose (*K*) ausgefüllt. Resorcinblaufärbung

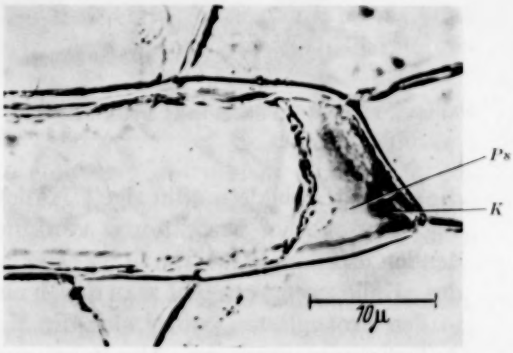


Abb. 7. Dieselbe Zelle (wie in Abb. 6) 5 min mit 0,9 mol Saccharoselösung behandelt. Der Protoplast hat sich weiter kontrahiert und von der Kallose (*K*) losgelöst. *Ps* Plasmastrang

In einer größeren Versuchsreihe wurden Epidermisstücke 1—20 min mit einer 0,1 mol Lösung von K-oxalat in doppelt destilliertem Wasser behandelt und anschließend in 0,55 mol Saccharoselösung übertragen. In keinem Falle konnte Kallosebildung festgestellt werden, selbst nach 48stündiger Plasmolyse war keine Kallose zu sehen. Übertrug man die Präparate etwa nach 12 Std in 0,15 mol $Ca(NO_3)_2$-Lösung, so wurde Kallose gebildet. Danach ist anzunehmen, daß das zelleigene Ca^{++} auch bei der Kallosebildung durch Zuckerplasmolyse beteiligt ist; wird es durch Oxalat ausgefällt, so kann anscheinend keine Kallose gebildet werden.

Der Unterschied in der Konsistenz zwischen der durch Plasmolyse mit Ca-Salzen und mit Zuckern erhaltenen Kallose mag durch folgende Versuchsergebnisse präzisiert werden: Behandelt man Epidermishäute 7 Std mit 0,55 mol Saccharose und überträgt sie dann für kurze Zeit in 0,9 mol Saccharose, so erkennt man am gefärbten Präparat, daß sich der

Protoplast unter dem Einfluß des stärkeren Plasmolytikums von der zuvor gebildeten Kallosehaut zurückgezogen hat (Abb. 6 und 7). Eine neue, zweite Kalloseschicht scheint jedoch nicht mehr gebildet zu werden, da nach 36stündigem Verbleiben in der 0,9 mol Saccharoselösung nichts derartiges beobachtet werden konnte. Andererseits wird eine bereits gebildete Kalloseschicht bei Deplasmolyse an die Zellwand gedrückt. Nach weiteren 10—18 Std ist sodann ein großer Teil der gebildeten Kallose wieder abgebaut worden. — Ganz anders verhält es sich, wenn man zunächst 7 Std mit 0,15 mol $Ca(NO_3)_2$ plasmolysiert und dann in 0,3 mol $Ca(NO_3)_2$ überträgt. In derart behandelten Präparaten hat sich

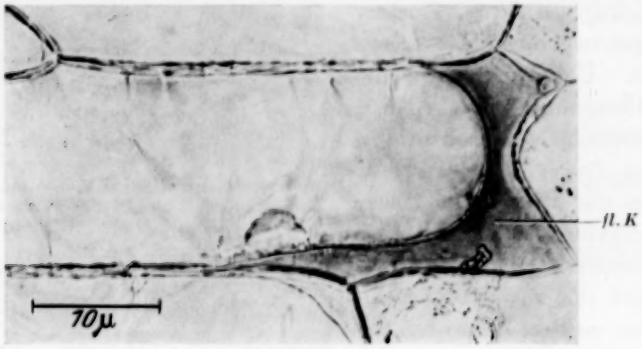


Abb. 8. Plasmolyse mit 0,2 mol $Ca(NO_3)_2$-Lösung. Der Plasmolysevorhof ist von „flüssiger" Kallose (*fl. K.*) gleichmäßig ausgefüllt

die vorerst gebildete „flüssige" Kallose (Abb. 8) über den gesamten Plasmolysevorhof verteilt und verdünnt, was an der schwächer werdenden diffusen Blaufärbung zu erkennen ist. Die gleiche Verdünnung des „Kallosesols" erreicht man durch einen Einstich mit einer Glasnadel in den Protoplasten, wobei sich die Kallose mit dem Zellsaft und der Außenlösung vermischt. Die dabei auftretende graublaue Verfärbung des toten Plasmas durch Adsorption von Farbstoffteilchen ist mit der Kallosefärbung nicht zu verwechseln. Unterwirft man mit 0,2 mol $Ca(NO_3)_2$ behandelte Zellen der Deplasmolyse, so tritt diese nur langsam ein. Die „flüssige" Kallose verteilt sich von den Zellpolen über die gesamte Protoplastenoberfläche. Nach einigen Stunden ist nichts mehr von einer Blaufärbung zu erkennen.

Die vorstehend beschriebenen Erscheinungen sind nicht auf die Zwiebelschuppen-Epidermis beschränkt; auch Mesophyllzellen der Zwiebelschuppe, vornehmlich in der Umgebung der Leitbündel, bilden Kallosehüllen bei Plasmolyse mit Ca-Salz- und Zuckerlösungen. Weiterhin konnte eine gleichartige Kallosebildung bei einer *Spirogyra* spec., einer *Oedogonium* spec. und mehreren Diatomeen-Arten festgestellt werden.

Interessanterweise scheinen Zellen, welche Anthocyan im Zellsaft führen, in der Plasmolyse keine Kallosehülle zu bilden (*Rhoeo discolor*, Epidermis der Blattunterseite; rote Zwiebelvarietäten; *Tradescantia*-Staubfadenhaare).

Diskussion

Das interessanteste Ergebnis der vorstehend beschriebenen Versuche darf vielleicht in folgender Tatsache gesehen werden: Es ist gelungen, durch reproduzierbare Bedingungen Pflanzenzellen, welche im Normalzustand nur Spuren von Kallose (als Tüpfelkallose) enthalten, zu einer raschen und kräftigen Kallosebildung zu veranlassen.

Es ist zu hoffen, daß sich hier ein Weg eröffnet, der zu einer besseren Einsicht in den Mechanismus der Kallosebildung und in die Funktion der Kallose in der Zelle führen mag.

Wie Currier und Strugger (1956) schreiben, beobachteten sie bei Hinzufügung von 0,2 mol Saccharose zur Anilinblaulösung eine intensivere Tüpfelkallus-Fluorescenz. Möglicherweise trat dabei bereits (es wurde bis zu 24 Std gefärbt!) eine Vermehrung der Tüpfelkallose unter dem Einfluß des Zuckers auf. Weiterhin beobachteten sie, daß bei Plasmolyse mit 1 mol Saccharose der Plasmolysevorhof eine der Kallose ähnliche Fluorescenz aufwies. Sie geben dafür die Erklärung, daß Kallosepartikel von der Oberfläche des Protoplasten in den Plasmolysevorhof einwandern.

Die bisher vorliegenden Angaben über das Auftreten von Kallose lassen sich am besten mit einer Funktion im Sinne eines „Schutzes", einer „Abwehr" oder eines „Abschlusses" in Einklang bringen (s. das Sammelreferat Eschrich 1957). Die hier mitgeteilten Befunde würden mit einer solchen Auffassung nicht in Widerspruch stehen. Sie geben übrigens ein recht eindrucksvolles Beispiel für die tiefgreifenden Veränderungen, die sich in einer plasmolysierten Zelle vollziehen können.

Die Versuche mit Salzlösungen und mit Lactose zeigen, daß die plasmolysierte Zelle die Kallose aus zelleigenen Bausteinen (Glucose) aufbaut.

Über die Permeabilitätsverhältnisse der Kalloseschichten wissen wir noch nichts, es wäre daher verfrüht, die Kallosebildung an plasmolysierten Protoplasten mit der „surface precipitation reaction" (Heilbrunn 1930) in Zusammenhang zu bringen[1].

Die negativen Ergebnisse bei der Plasmolyse mit Alkalisalzen lassen sich vorläufig vielleicht in folgender Weise deuten: Durch Alkali-Ionen wird die Plasmolyseintrabilität erhöht, wodurch Kappenplasmolyse eintritt. Gleichzeitig wird aber auch die Salzpermeabilität gehemmt

[1] Über die Regenerations- oder Vernarbungsmembranen, die bei plasmolysierten Protoplasten beobachtet wurden, vgl. die Literaturzusammenstellung bei Stadelmann (1956).

(Tonoplastenplasmolyse). Möglicherweise wird durch die Permeabilitätserniedrigung des Tonoplasten ein Auswandern von Zuckern aus dem Zellsaftraum unterdrückt, so daß es zu einem Mangel an Kallosebausteinen an der Plasmaoberfläche kommt.

Was die Unterschiede der Konsistenz der Kallose bei Plasmolyse in Zucker- und in Ca-Salz-Lösungen betrifft, so könnte mit Vorbehalt auf die kalloselösenden Eigenschaften von Ca-Salzen hingewiesen werden, über welche Mangin (1910) berichtet hat. Nach ihm wird Kallose von konzentrierten $CaCl_2$- und $SnCl_2$-Lösungen gelöst. Baerecke (1955) konnte das bei ihrem Untersuchungsmaterial allerdings nicht bestätigen.

Zusammenfassung

Es wird festgestellt, daß *Allium cepa*-Epidermiszellen bei Plasmolyse mit Zuckerlösungen eine extraplasmatische Hülle von Kallose ausbilden können. Bei Plasmolyse mit Ca-Salzlösungen tritt an Stelle der festen Kallose ein Kallosesol im Plasmolysevorhof auf. Alkalimetallsalze und Harnstofflösungen verursachen keine Kallosebildung. Der früheste Zeitpunkt der Kallosebildung wurde nach $1^1/_2$stündiger Plasmolyse mit schwach karamelisierter Fructose beobachtet.

Literatur

Baerecke, M.-L.: Der Nachweis der Blattrollinfektion bei Kartoffeln durch ein neues Färbeverfahren. Züchter **25**, 309—313 (1955). — Currier, H. B., u. S. Strugger: Anilin blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L. Protoplasma (Wien) **45**, 552—559 (1956). — Eschrich, W.: Ein Beitrag zur Kenntnis der Kallose. Planta (Berl.) **44**, 532—542 (1954). — Kallose. (Sammelreferat) im Druck. Protoplasma (Wien) **1957**. — Heilbrunn, L. V.: The surface precipitation reaction of living cells. Proc. Amer. Phil. Soc. **69**, 295 (1930). Mangin, L.: Nouvelles observations sur la callose. C. r. Acad. Sci. Paris **151**, 279—283 (1910). — Stadelmann, E.: Plasmolyse und Deplasmolyse. In Ruhlands Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II (S. 66ff.). Berlin: Springer 1956. — Strugger, S.: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze, 2. Aufl. Berlin: Springer 1949.

Dr. W. Eschrich, Bonn, Meckenheimer Allee 170a,
Pharmakognostisches Institut der Universität

Planta, Bd. 48, S. 587—591 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

CAROTINOIDBILDUNG UND STICKSTOFFUMSATZ

Von

K. PAECH †*

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 28. Oktober 1956)

Vor einigen Jahren haben wir die Vorstellung entwickelt, daß die Bausteine für die verschiedensten sekundären Pflanzenstoffe aus den allgemeinen C_2- und C_3-Intermediärverbindungen des Kohlenhydratumsatzes entnommen werden und daß somit die Synthese sekundärer Verbindungen ein Zeichen reichlichen Zuckerumsatzes sei (PAECH 1950, S. 256ff.). Experimentelle Belege dafür waren zu jener Zeit noch spärlich, aber inzwischen sind einige Teilprozesse der Biogenese solcher Pflanzenstoffe aufgeklärt worden, die jene Auffassung bestätigen und erweitern (z. B. Die Bildung des Bauelementes für die Biosynthese der Isoprenoide; vgl. BONNER, PARKER u. MONTERMOSO). Das isolierte Studium der für die Synthese bestimmter Naturstoffe nötigen Enzymsysteme stellt zwar den ersten Schritt in ein neues Gebiet des Stoffumsatzes dar, aber es gibt noch keine befriedigende Erklärung für die physiologische Rolle der geklärten Vorgänge in der Pflanze. Dazu führen nur die Untersuchungen des Stoffwechsels der intakten Pflanze (vgl. auch CHANCE).

Durch Anwendung von Enzymhemmstoffen, Chloroformnarkose, vermindertem Sauerstoffdruck und durch andere schonende Eingriffe, deren es beim Arbeiten mit intakten Pflanzen leider nur sehr wenige gibt, konnte im hiesigen Institut für die Bildung von Anthocyanen, Carotinen, Chlorogensäure und ätherischen Ölen wahrscheinlich gemacht werden, daß tatsächlich der allgemeine intermediäre Umsatz entscheidend an der Synthese dieser sekundären Stoffe beteiligt ist (EBERHARDT, BEEKMANN, RUCKENBROD, SIGRIST). Es bleibt dabei allerdings noch immer die Möglichkeit offen, daß sich dessen Mitwirkung eher auf die Bereitstellung von Energie — etwa in Form energiereicher Phosphatbindungen — als auf die Lieferung von Bausteinen erstreckt.

Wenn die oben erwähnte Vorstellung richtig ist, daß die Bausteine für sekundäre Verbindungen aus dem Vorrat der Kohlenhydratbruchstücke entnommen werden und ihren Ursprung nicht in speziellen vorbereitenden Vorgängen haben, dann müssen konkurrierende Prozesse,

* Aus dem wissenschaftlichen Nachlaß zusammengestellt von FRANK EBERHARDT, Botanisches Institut Tübingen.

die ebenfalls von den allgemeinen Intermediärverbindungen zehren, die Synthesen der betreffenden sekundären Stoffe einschränken. Die durch die Kapazität des glykolytischen (oder oxydativen) Abbauweges und der anschließenden Umwandlungen bestimmte Menge der Glucosefragmente wäre also das Material, das die konkurrierenden Vorgänge zur Verfügung hätten, so daß aus der erhöhten Zufuhr zu dem einen eine verminderte Beschickung des anderen resultieren würde.

Weiterhin muß, wenn die Vorstellung von *sekundären* Stoffen eine Berechtigung hat, ein Vorgang, welcher *primären* Synthesen — etwa der Eiweißsynthese — dient, den Vorrang bei der Versorgung mit den Kohlenhydratfragmenten haben. Die allgemeinen Bausteine müßten also bevorzugt in die Synthese zellnotwendiger, unerläßlicher Stoffe gezogen werden, und die Bildung der sekundären Verbindungen müßte zurückstehen. Voraussetzung für den experimentellen Nachweis eines solchen Zusammenhanges ist natürlich, daß für die Versuche Pflanzen herangezogen werden, in denen die primären Synthesen nicht schon maximal verlaufen, d.h. gesättigt sind.

Ein aus solchen Überlegungen angeregter Tastversuch hatte tatsächlich gezeigt, daß durch Harnstoffgabe die Carotinoidsynthese in etiolierten Weizenkeimlingen gehemmt werden kann (Beekmann).

Die im folgenden zu beschreibenden Versuche sollten klären, ob und in welcher Weise der Stickstoffumsatz in Keimlingen die Bildung bzw. Ansammlung von Carotinoiden beeinflußt. Es sollte also ein Vorgang einer lebensnotwendigen Synthese gegen die Synthese sekundärer Stoffe ausgespielt werden, um zu erfahren, ob und wie beide miteinander zusammenhängen. Für die Lösung dieser Frage schienen die etiolierten Weizenkeimlinge besonders geeignet, in denen ohne zusätzliche Stickstoffversorgung die Eiweißsynthese sehr beschränkt ist. Da Getreidekörner kohlenhydratreich und relativ stickstoffarm sind, wird bei fehlender N-Zufuhr die Eiweißbildung bald eingestellt. Durch Fütterung von verwertbarem, löslichem Stickstoff — z.B. in Form von Harnstoff — wird die Eiweißbildung in etiolierten Keimlingen gefördert. Damit sind also die oben für die Lösung der Frage geforderten Voraussetzungen in diesem Objekt hinreichend erfüllt.

Versuche. Für die Versuche wurde Handelssaatgut der Winterweizensorte „Strubes Frühweizen" verwendet. Die Körner wurden in hohen Einweckgläsern unter Zugabe von Wasser bzw. Harnstofflösungen eingequollen und bei 23° C zum Auskeimen gebracht. Die Lösungen wurden öfter gewechselt. Nach 6, 8 und 10 Tagen wurde jeweils eine Serie aufgearbeitet. Die Versuche wurden in ähnlicher Form ein zweites Mal wiederholt.

Je 50 Keimlinge wurden schonend getrocknet (14 Std bei 50° C; vgl. Beekmann) und danach mit Chloroform extrahiert. Im Extrakt wurde die Absorption bei 455 mμ gemessen. 25 weitere Keimlinge wurden im Mörser zerrieben, mit 5%iger Trichloressigsäure über Nacht im Eisschrank stehengelassen und durch Abnutschen in die Fraktionen „Eiweiß-N" und „lösliche N-Verbindungen"

getrennt. Die beiden Fraktionen wurden getrennt verascht, und der N-Gehalt wurde nach KJELDAHL bestimmt.

Harnstoff wurde in 0,05-, 0,1- und 0,2%igen Lösungen geboten. Auch die höchste Harnstoffkonzentration hat die Keimlinge nicht geschädigt. Sie waren am Licht voll ergrünungsfähig. Die mit N-Lösungen versorgten Keimpflanzen waren kräftiger als die Kontrollen.

Die Analysenergebnisse sind in der Abbildung zusammengestellt. Nach *6 Tagen* ist der Eiweißspiegel durch die Harnstoffzufuhr noch nicht beeinflußt, aber der Gehalt an löslichen N-Verbindungen — in der Hauptsache wohl Aminosäuren und Amide — hat gegenüber der N-frei ge-

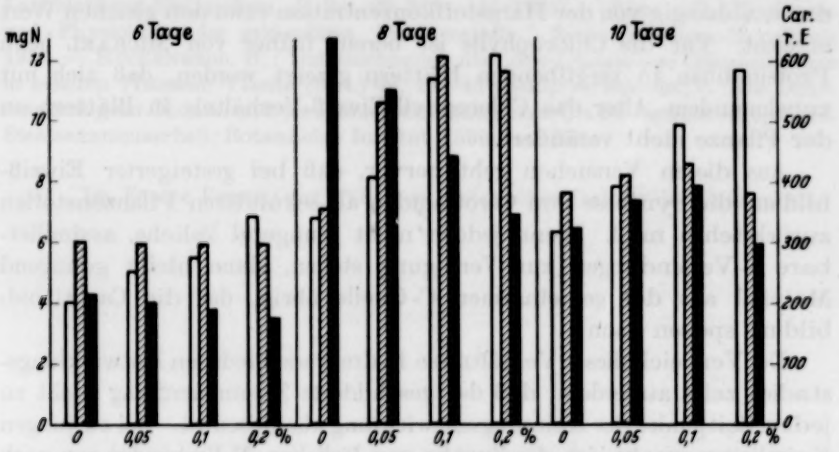


Abb. 1. Eiweiß-N (schraffiert), löslicher Stickstoff (weiß) und Carotinoide (schwarz; relative Einheiten) in Weizenkeimpflanzen bei Fütterung verschiedener Harnstoffkonzentrationen. 6, 8, 10 Tage nach der Aussaat. Abszisse: Konzentration der Harnstofflösung in Prozenten

zogenen Kontrolle deutlich zugenommen. Für die Synthesen in dieser Fraktion sind aus dem Kohlenhydratabbau C-Gerüste entzogen worden. In Übereinstimmung mit der eingangs beschriebenen Vorstellung ist der Carotinoidgehalt in den N-reichsten Keimlingen bereits merklich niedriger (um 20%) als in der Kontrolle. Nach *8 Tagen* hat der Gehalt an löslichen N-Verbindungen bei 0,2%igem Harnstoff fast das Doppelte der Kontrollen erreicht. Auch der Proteingehalt ist bei den Harnstoffserien wesentlich erhöht. Daß bei Konzentrationen über 0,1%igem Harnstoff keine weitere Steigerung der Eiweißbildung auftritt, kann daran liegen, daß das Angebot an chemisch nutzbarer Energie zwar noch zu einer gesteigerten Festlegung des Harnstoffes in löslichen N-Verbindungen, jedoch nicht mehr zu weiterer Proteinsynthese ausreicht. Die Carotinoidsynthese bleibt in diesem Stadium mit zunehmender N-Gabe weit zurück. Bei 0,2%igem Harnstoff ist der Carotinoidgehalt nahezu nur halb so groß wie in den Kontrollen. Hieraus geht am deutlichsten die gegenläufige Bildung von Protein bzw. pflanzeneigenen N-Verbindungen und Carotinoiden hervor.

Nach *10 Tagen* hat sich das Bild wesentlich verändert. Es scheint dem nach 8 Tagen Keimung beobachteten Zustand zu widersprechen. In den vorhergegangenen 2 Tagen hat jedoch keine Synthese von Eiweißen und Carotinoiden mehr stattgefunden, hingegen ist nach dem Verbrauch der Kohlenhydratreserven sowohl der Protein- als auch der Carotinoidgehalt abgesunken. Einerseits entsteht dabei der Eindruck, als würden bei höherem Eiweißgehalt die Carotinoide im allgemeinen mehr geschont werden, andererseits sieht es so aus, als würde sich zwischen Pigmentgehalt und Eiweißmenge ein Verhältnis einstellen, das unabhängig von der Harnstoffkonzentration etwa den gleichen Wert erreicht. Für die Chlorophylle ist bereits früher von Michael beim Proteinabbau in vergilbenden Blättern gezeigt worden, daß sich mit zunehmendem Alter das Chlorophyll/Eiweiß-Verhältnis in Blättern an der Pflanze nicht verändert.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei gesteigerter Eiweißbildung die Synthese von Carotinoiden als sekundären Pflanzenstoffen zurückstehen muß. Wenn jedoch nicht genügend lösliche, assimilierbare N-Verbindungen zur Verfügung stehen, dann bleibt genügend Material aus der gemeinsamen C-Quelle übrig, das die Carotinoidbildung speisen kann.

Der Vergleich dieser Verhältnisse in drei verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt außerdem, daß der geschilderte Zusammenhang nicht zu jedem Zeitpunkt der Keimlingsentwicklung abzulesen ist. Bei zu jungen Keimlingen macht sich die Zugabe von löslichen N-Verbindungen noch nicht im Proteingehalt bemerkbar. Bei zu alten Pflanzen überwiegen bereits die Abbauvorgänge. Nur in der Periode der intensivsten Aminosäure- und Eiweißsynthese macht sich die Konkurrenz um die C-Bausteine bemerkbar.

Die einleitend geschilderten Verhältnisse haben also in bezug auf die Carotinoide eine Bestätigung erfahren. Aus Beobachtungen an anderen Objekten lassen sich ganz entsprechende Schlüsse ziehen, wenn auch die Experimente unter z. T. andersartigen Gesichtspunkten angestellt wurden. So setzt bei *Haematococcus pluvialis* die Carotinoidsynthese erst ein, wenn Stickstoff der begrenzende Faktor für das Wachstum der Kulturen wird (Droop). Wenn Mycelien von *Phycomyces* auf ein Medium übertragen werden, das Glucose aber keinen Stickstoff enthält, so ist die Carotinsynthese relativ größer als auf einem Medium mit Stickstoff (Goodwin u. Willmer). Bei anderen sekundären Pflanzenstoffen weisen die von uns gesammelten Erfahrungen in die gleiche Richtung, so daß sich darin wohl — wie vermutet — ein allgemeines Gesetz des pflanzlichen Stoffwechsels ausdrückt.

Frau Dr. H. Vogt-Beekmann sei für ihre Mitarbeit bei den Versuchen an dieser Stelle herzlich gedankt.

Literatur.

Beekmann, H.: Untersuchungen über den Umsatz von Carotinoiden in höheren Pflanzen. Z. Bot. **42**, 387—435 (1954). — Bonner, J., M. W. Parker and J. C. Montermoso: Biosynthesis of rubber. Science (Lancaster, Pa.) **120**, 549—551 (1954). — Chance, B.: Enzyme-substrate compounds. Adv. Enzymol. **12**, 153—190 (1951). — Droop, M. R.: Carotenogenesis in Haematococcus pluvialis. Nature (Lond.) **175**, 42 (1955). — Eberhardt, F.: Über die Beziehungen zwischen Atmung und Anthocyansynthese. Planta (Berl.) **43**, 253—287 (1954). — Goodwin, T. W., and J. S. Willmer: Studies on carotenogenesis. Nitrogen metabolism and carotene synthesis in Phycomyces bl. Biochemic. J. **51**, 213—217 (1952). — Michael, G.: Über die Beziehungen zwischen Chlorophyll- und Eiweißabbau im vergilbenden Laubblatt von Tropaeolum. Z. Bot. **29**, 385—425 (1935). — Paech, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1950. — Ruckenbrod, H.: Untersuchungen über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **46**, 19—45 (1955). — Sigrist, P.: Die Differenzierung der Ölzellen und die Bildung des ätherischen Öls bei Asarum europaeum. Staatsexamensarbeit, Botanisches Institut Tübingen 1953.

Dr. Frank Eberhardt, Tübingen, Botanisches Institut der Universität

Planta, Bd. 48, S. 592—621 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ZUR CHROMATOGRAPHIE DER LIPOIDLÖSLICHEN BLATTFARBSTOFFE

Von

ACHIM HAGER

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. August 1956)

I. Die quantitative Trennung der Blattfarbstoffe mit Hilfe der Säulenchromatographie

1. Allgemeines

Beim Trennen der Blattpigmente treten zwei Schwierigkeiten auf. Die eine liegt bereits bei der Extraktion der Farbstoffe aus dem Blatt. Diese gelingt nämlich leicht und — worauf es ja besonders ankommt — vollständig mit Lösungsmitteln wie Methanol, Äthanol, Aceton, Chloroform usw., aber schwer und unvollständig mit Benzin, Petroläther, also Alkanen. Gerade aber in den letzteren müssen die Farbstoffe gelöst sein, wenn eine Trennung am Adsorbens erfolgen soll. In den erstgenannten Medien wird die Adsorptionsfähigkeit der darin gelösten Stoffe so stark inaktiviert, daß sie die Säule ohne Verzögerung und Aufteilung passieren.

Die zweite Schwierigkeit besteht darin, an der verhältnismäßig kurzen Strecke der Säule die Farbstoffe so durch einen Entwickler zur Verteilung zu bringen, daß die einzelnen Zonen gut voneinander isoliert sind.

Ein Verzicht auf eine solche Trennung des Pigmentextraktes wäre dann möglich, wenn es nur auf die Mengenbestimmung der Chlorophylle ankäme (welche durch Extinktionsmessung in einem Spektralphotometer bei bestimmten Wellenlängen erfolgen kann; RUDOLPH 1934, COMAR u. ZSCHEILE 1941). Müssen aber danach die Carotinoide durch Verseifung der Chlorophylle und anschließende chromatographische Trennung gewonnen werden, so ist keine Vereinfachung erreicht worden; außerdem treten (durch den Verseifungsvorgang) Verluste bei den gelben Farbstoffen ein (nach SEYBOLD u. EGLE 1938, S. 106, Tabelle 14).

Es ist auf verschiedene Weise versucht worden, der Schwierigkeiten bei der chromatographischen Trennung der Blattpigmente Herr zu werden (s. SPOHN 1935, STROTT 1938, SEYBOLD u. EGLE 1938, 1939, SIMONIS 1939, STRAIN 1942, SEYBOLD 1943, BUKATSCH 1940, 1951, WENDEL 1940, 1950, CLAUSS 1954).

Die im folgenden beschriebene Methode soll ein neuerlicher Versuch sein, die säulenchromatographische Trennung zu verbessern und den Analysengang zu verkürzen.

2. Die neu ausgearbeitete Methode

a) Die Gewinnung des Pflanzenextraktes. Das Extrahieren der Farbstoffe mittels Benzin + Tropfen von Methanol ist hinreichend, wenn es sich um weniges und um ausgewachsenes Pflanzenmaterial handelt. Sollen die Pigmente aber aus jungen Geweben, z. B. jungen Haferpflanzen, und aus einer größeren Menge (wegen des besseren Durchschnitts) gewonnen werden, so ist eine quantitative Extraktion nicht mehr möglich. Das Gemenge aus Quarzsand und Blattbrei wird nie richtig farblos, wenngleich es länger als die übliche Zeit, die schon 15—30 min beträgt, im Mörser bearbeitet wird. Außerdem treten bei lang andauernden Extraktionsvorgängen Veränderungen der Farbstoffe ein. Besonders beim Chlorophyll a ist die Gefahr einer wahrscheinlichen Zusammenlagerung von Molekülen sehr groß. Daneben muß noch auf die Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit der Farbstoffe, die sich in einer erhöhten Phaeophytinbildung ausdrückt, geachtet werden. Es darf deshalb auf keinen Fall das Pflanzenmaterial ohne Zugabe eines Lösungsmittels, also praktisch an der Luft, zerkleinert werden.

Eine andere Extraktionsmethode mit 7 Teilen 95%igem Methanol und 3 Teilen Benzin (Seybold und Egle 1939) bringt zwar bessere Ergebnisse, dafür aber den Nachteil, der sich aus den entstandenen 2 Phasen ergibt: Die methanolische Phase behält immer wechselnde Mengen der Chlorophylle und der epiphasischen Xanthophylle, während umgekehrt im Benzin noch kleine Mengen von hypophasischen Xanthophyllen verbleiben, auch nach einem umständlichen mehrmaligen Ausschütteln. Es stellt sich eben nur ein Gleichgewicht ein (temperaturabhängig!), ohne Anspruch auf vollständige Entmischung der beiden Farbstoffgruppen. Die Bemerkung Spohns (1935) „88%iges Methanol nimmt Spuren von Chlorophyll auf, aber nicht 85%iges", ist unrichtig.

Das Ausziehen der Blattfarbstoffe und ihre weitere Behandlung wurden deshalb anders durchgeführt.

Als Extraktionsmittel diente Aceton. Die Befürchtung, es würde schwach sauer reagieren und deshalb nicht geeignet sein, konnte zerstreut werden. Nur ein unmeßbar geringer Prozentsatz von Aceton-Molekülen kommt in der tautomeren Enol-Form vor ($H_3C—\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{C}}=CH_2$; Gattermann u. Wieland, S. 232). Es wurden auch niemals Abbau-Erscheinungen der gelösten Chlorophylle beobachtet (Verluste bei Seybold durch den nicht peroxydfrei gemachten Ätheranteil?).

Um die Zeit der Blattfarbstoff-Extraktion möglichst abzukürzen, wird diese im Multimix (bei 15000 Umdrehungen/min) durchgeführt, in einem $^1/_4$ l-Gefäß, das aus einem Aluminiumblock herausgedreht worden war.

Da die übliche Gummidichtung zwischen Gefäß und Messerscheibe den Lösungsmitteln nicht standhält, wurde das Gefäß mit einer aus Mennige + Glycerin bestehenden Bindemasse, die dann erhärtet, fest eingekittet.

Das Blattmaterial (3 g Frischgewicht) wird darin zunächst mit etwas (Spatelspitze) $CaCO_3$ zur Neutralisation der Pflanzensäuren versetzt und

mit 40 cm³ Aceton + 10 cm³ Benzin übergossen. Nach zwei Minuten Laufzeit des Motors auf Stufe II erfolgt das Abgießen der Lösung durch eine Filternutsche, die mit einer Na_2SO_4-Schicht versehen wurde, um ein allmähliches Verstopfen der Filterporen zu vermeiden. Dann nochmaliges Nachspülen des Mix-Gefäßes mit 40 cm³ Aceton + 10 cm³ Benzin, nach 2 Minuten Laufzeit wieder Abgießen durch die Nutsche.

Dieser kurze Vorgang genügt meist, aus Pflanzengeweben die Farbstoffe vollkommen zu entfernen. Die Blattreste auf dem Filter sind dann farblos; bei sehr alten Pflanzen können sie durch Chlorophyllide schwach gelblich-grün gefärbt sein.

Eine einfache Überführung der lipoidlöslichen Pigmente aus dem Aceton durch Verdünnen mit Wasser in die Benzin-Phase, d. h. aus einem für die Plastiden-Farbstoffe guten Lösungsmittel wie Aceton (oder auch Methanol) in ein für sie z. T. schlechteres Lösungsmittel, scheiterte bislang an einer starken Emulsionsbildung, die eine Entmischung der beiden Phasen und damit ein genaues quantitatives Arbeiten nicht möglich machte. Das „Hinüberdrücken" der Farbstoffe in die Benzinphase gelingt aber, wenn man an Stelle von Wasser eine 10%ige NaCl-Lösung verwendet.

Man läßt also im Scheidetrichter zu dem Aceton-Benzin-Extrakt (s. oben), dem man noch ungefähr 15 cm³ Benzin zugegeben hat, vorsichtig etwa 400 cm³ Salzlösung zulaufen, wartet vor dem Umschütteln eine Weile und tut dies dann mit kreisenden Bewegungen; läßt wiederum eine Zeit absetzen, bevor man erneut sehr vorsichtig umschüttelt, damit an der Grenzfläche der beiden Phasen keine Emulsionsbildung eintritt, die sich sonst beim Ablassen der unteren (Aceton-)Lösung unangenehm bemerkbar machen kann. Die obere (Benzin-)Phase sieht grün aus und enthält alle Plastidenpigmente; die untere Phase, die verdünnte Aceton-NaCl-Lösung, die man verwirft, erscheint trüb und manchmal etwas gelblich gefärbt. Dies ist aber nicht etwa auf noch vorhandene Carotinoide zurückzuführen, sondern auf Flavone, die durch das hydrophile Aceton aus den Geweben mit herausgelöst worden sind.

Zur Benzin-Lösung gibt man nun noch ungefähr 400 cm³ dest. Wasser, damit die letzten Reste von Aceton ausgewaschen werden. Erst nach einer Weile schüttelt man wieder vorsichtig („kreisend") um und läßt dann das Wasser ab.

Die Benzin-Lösung wird schließlich in einem 50 cm³- oder 100 cm³-Meßzylinder bis zur Marke aufgefüllt. Spuren von emulgiertem Wasser, die u. U. bei der nachfolgenden Chromatographie stören können, kann man leicht durch einige Spatelspitzen Na_2SO_4 binden, oder man wartet, bis sie sich selbst absetzen (Lösung dabei in den Kühlschrank stellen!).

Es befinden sich jetzt also die gesamten lipoidlöslichen Farbstoffe (von 3 g Pflanzenmasse) in 50 cm³ Benzin. Neben dem gewünschten

Wechsel des Lösungsmittels für die Pigmente ist auch noch eine ziemliche Konzentrierung der Farbstoffe in Benzin erreicht worden.

Bei den geschilderten Arbeitsvorgängen soll immer darauf geachtet werden, daß sie bei nicht allzu hoher Raumtemperatur vorgenommen werden, und daß möglichst wenig Licht an die Farbstoff-Lösung kommt, da sonst unerwünschte Farbstoff-Zersetzungen eintreten (s. auch NAGEL 1940 und SACHSSE S. 31).

b) Die Trennung der Plastidenpigmente an der Stärkesäule. Neben anderen Adsorbentien eignet sich zur Chromatographie der Blatt-Pigmente wegen ihres hydrophoben Charakters und nicht zuletzt wegen ihrer Billigkeit besonders Kartoffelstärke (das Stärkemehl von Getreidearten ist wegen seiner geringen Korngröße und seiner damit zusammenhängenden größeren Dichtigkeit wenig vorteilhaft).

Die käufliche Kartoffelstärke (hier von Fa. Bender & Hobein, München) wird den Anforderungen entsprechen, wenn sie vor Gebrauch mehrere Tage bei ungefähr 50° C getrocknet wird. Auf keinen Fall dürfen höhere Temperaturen angewendet werden, auch nicht kurzzeitig; die Adsorptionsfähigkeit geht sonst verloren. Das Kartoffelmehl soll dann eine staubende Konsistenz haben und darf keine Klümpchen mehr bilden. Stärke von verschiedenem Feuchtigkeitsgehalt hat ein verschieden großes Bindungsvermögen für Farbstoff-Moleküle und deshalb auch unerwünschte unterschiedliche Trenneffekte.

Bei laufender Wasserstrahlpumpe wird das Kartoffelmehl in die Säule gegeben (unten Watte) und dann im Vakuum (Handballen verschließt die obere Röhrenöffnung) durch Beklopfen der Glaswand zusammengeschüttelt, schließlich noch durch einen Stopfer von oben zusammengedrückt.

Aus den 50 cm^3 Farbstofflösung (s. oben) pipettiert man je nach Pigment-Gehalt der verwendeten Pflanzen 6—8 cm^3 in die Stärkesäule (also $^6/_{50}$—$^8/_{50}$ des Pigment-Gehaltes von 3 g Pflanzenmasse; je geringer die Menge ist, desto besser ist die Trennung), läßt einsaugen, gibt zunächst reines Benzin zu, damit das an der Lösungs-Front wandernde Carotin etwas Zwischenraum zu den übrigen Farbstoffen bekommt, und gießt dann den Entwickler nach.

Die Beobachtung, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Farbstoffe an der Säule sich durch verschiedene Lösungsmittel nicht gleichsinnig ändert (s. auch Papierchromatographie), führte nach zahlreichen Versuchen schließlich zur Auffindung eines „Entwickler-Gemisches", zusammengesetzt aus 5 Lösungsmitteln, welches eine gute Aufteilung und Trennung der Pigmente — in unserem Falle also aller Pigmente — bewirkt, ohne daß einzelne Farbstoffzonen sich noch überlagern.

Um eine genügende Laufstrecke zur Verfügung zu haben, wurden Säulen mit 50 cm Länge verwendet (⌀ 2 cm).

Die Zusammensetzung des Gemisches in Volumen-Einheiten:

Benzin (Siedebereich 100—140° C)	60
Benzol	35
Chloroform (HCl-frei)	1,25
Aceton	0,55
Isopropanol	0,06

Beim fertig entwickelten Chromatogramm lassen sich 6 verschiedene Farbzonen unterscheiden (s. Abb. 1). Es handelt sich dabei, wie die spektroskopischen Bestimmungen ergeben haben, um (von oben nach unten):

1. eine hellgelbe Zone . . . . . = Neoxanthin
2. eine gelb-grüne Zone . . . . . = Chlorophyll b
3. eine blau-grüne Zone . . . . . = Chloroyphll a
4. eine gelbe Zone . . . . . = Violaxanthin
5. eine rötlich-gelbe Zone . . . . . = Lutein
6. eine gelbe Lösung in der Saugflasche . = Carotin

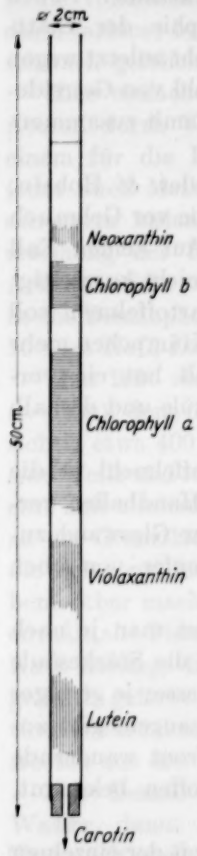


Abb. 1. Chromatogramm der Chloroplastenfarbstoffe an einer Stärkesäule

Wenn säurehaltige Lösungsmittel verwendet wurden, oder wenn der Extrakt längere Zeit im Licht gestanden hat und mit der Luft in Berührung war, wird unterhalb vom Lutein ein grauer Streifen von Phaeophytin sichtbar. Wird der Analysengang zu lange ausgedehnt (über mehrere Stunden), und läßt man dabei die Lösung in der Wärme stehen, so treten die schon erwähnten Zusammenlagerungen von Chlorophyll-a-Molekülen ein, welche eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit haben und dadurch das hellgelbe Neoxanthin überlagern. Dieses erscheint dann ähnlich gefärbt wie das Chlorophyll b und ist davon nur noch schlecht oder gar nicht mehr zu unterscheiden. Auch das gelblich-grüne Chlorophyll b sieht durch die eingelagerten Streifen mehr blaugrün aus, ähnlich dem Chlorophyll a.

Bei jungen, wenig stark beleuchteten Pflanzen (z. B. aus dem Gewächshaus) treten als Xanthophylle hauptsächlich Violaxanthin und Lutein auf, bei stark bestrahlten Pflanzen zusätzlich noch Zeaxanthin und Xanthophyllepoxyd, die im Chromatogramm zwischen den beiden erstgenannten lokalisiert sind. Diese Xanthophyll-Komponenten lassen sich mit dieser Methode nicht mehr trennen. Es kann bei solchen Pflanzen der Xanthophyllwert nur als Ganzes bestimmt werden.

Wenn das Lutein bis auf Handbreite das untere Ende der Säule erreicht hat, soll oben die Entwickler-Flüssigkeit vollständig in die Stärke eingesogen sein. Man läßt die Wasserstrahlpumpe dann noch solange laufen, bis das Lutein die Abdichtungswatte erreicht.

c) Das Eluieren und die quantitative Bestimmung der Farbstoffe. Die Stärke wird nun aus der Säule herausgestoßen oder mit einer Spatel entnommen, und dabei werden die verschieden gefärbten Komponenten getrennt in kleine Bechergläser gegeben. Nun gießt man peroxydfreien Äther zu, schüttet die Suspension in eine Nutsche, saugt die Lösung mit dem herausgelösten Farbstoff in einen Meßzylinder, füllt bis 50 cm^3 auf und bewahrt sie bis zur Messung gut verschlossen im Dunkeln auf.

Der verwendete Äther, nach den üblichen Methoden peroxyd-frei gemacht und getrocknet (GATTERMANN u. WIELAND), soll über gepulvertem Eisen-II-Sulfat stehend vor Licht geschützt werden (bei vorhandenen Peroxyden $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$). Nach einer neueren Methode präpariert man den Äther, indem man ihn durch eine Säule mit aktivem Aluminium-Oxyd schickt; die Probe auf Peroxyde mit Vanadin-Schwefelsäure wird dann ebenfalls negativ verlaufen.

Um subjektive Meßfehler auszuschalten, wurde für die Extinktionsmessung der isolierten Farbstoffe nicht mehr das Pulfrich-Stufenphotometer verwendet, sondern das lichtelektrische Kolorimeter nach LANGE.

Für die Chlorophylle a und b wurde ein Rotfilter (Lichtdurchlässigkeit 600—680 $m\mu$) in den Strahlengang eingeschaltet, für Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein und Carotin ein Blaufilter (Durchlässigkeit 410 bis 510 $m\mu$).

II. Die Trennung der Blattfarbstoffe mit Hilfe der Papierchromatographie

1. Die bisherigen Trennerfolge und die Probleme der neuen Methode

Wenn M. TSWETT als Stammvater der Säulenchromatographie gilt, so ist es für die Papier-Chromatographie neben RUNGE (1850) zweifellos SCHOENBEIN, der Anfang der sechziger Jahre des vorigen Jahrhunderts seine Arbeit „über einige durch die Haarröhrchen-Anziehung des Papiers hervorgebrachte Trennwirkungen" veröffentlichte. Darauf aufbauend führte F. GOPPELSROEDER an Filterpapierstreifen, die in die zu untersuchende Lösung eingetaucht wurden, bereits Trennungen organischer Farbstoffe durch und untersuchte von 1880—1901 nicht weniger als 49 Pflanzenfamilien mit 77 Gattungen und 93 Arten auf die Zusammensetzung ihrer (Misch-)Farben. Heute erscheinen die Ergebnisse, die sich in der Aufzählung der gefundenen grünen, gelben, braunen Flecken und der Steighöhen erschöpften, ziemlich wertlos im Gegensatz zur Methode, die im Prinzip wieder angewendet wird.

Daß freilich die Schwierigkeiten, zu einer brauchbaren papierchromatographischen Trennung der Plastidenpigmente zu kommen, sehr groß sind, beweisen die Arbeiten von BAUER (1952), ASAMI (1952), LIND, LANE und GLEASON (1953), STRAIN (1953), DOUIN 1953), SIRONVAL (1954), in denen nicht viel mehr als von einer bloß sichtbaren Aufteilung der Plastiden-Farbstoffe in die schon bekannten Komponenten berichtet wird, und zum Teil einzelne Farbflecke nur auf Grund einer Vermutung oder überhaupt nicht identifiziert werden konnten; denn die geringen Stoffmengen, mit denen die Papierchromatographie normalerweise arbeitet, machten eine spektroskopische Farbstoffbestimmung nicht ohne weiteres möglich.

Eine gute Isolierung der Flecken voneinander gelang nur im zweidimensionalen Chromatogramm (LIND u. a. 1953). — Die Trennung bei STRAIN 1953 ist, wenn man von den noch vereinigten Farbstoffen Lutein und Zeaxanthin absieht, nur scheinbar vollkommen, denn durch das Chlorophyll a wird zwischen Lutein und Violaxanthin noch ein weiteres Xanthophyll verdeckt.

Ein zweidimensionales Chromatogramm ist aber nur bei kleinen Farbstoff-Quantitäten durchführbar, die punktförmig aufgetragen werden. Es ist jedoch das Ziel, solche Mengen verwenden zu können, daß sie nach dem Eluieren für eine spektroskopische Identifizierung und schließlich auch für quantitative Bestimmungen ausreichen. Es läßt sich also nicht umgehen, den Farbstoff-Extrakt in breiter Front als Streifen am einen Ende eines möglichst dicken und saugfähigen Papieres aufzutragen.

Für die nun eindimensionale Trennrichtung muß freilich erst ein brauchbarer Entwickler geschaffen werden, der, wenn überhaupt, nur durch Kombinierung der Pigment-Lösungsmittel zu erhalten sein wird.

Ein solcher kompliziert zusammengesetzter Entwickler wirft aber neue Probleme auf. In einem geschlossenen Raum werden seine einzelnen Komponenten nach einiger Zeit einen bestimmten Sättigungs-Dampfdruck erreichen. Es wird sich zwischen Flüssigkeits- und Dampfphase ein Endgleichgewicht einstellen, das für das Gelingen der papierchromatographischen Trennung von großer Bedeutung ist. Wird der Sättigungs-Dampfdruck nicht erreicht, so dampfen von den im Papier aufsteigenden Lösungsmitteln immerfort Teile weg, während der Nachschub weitergeht, so daß in Frontnähe die Farbstoffzonen ungünstig zusammengeschoben werden; ferner sind die verschiedenen Siedepunkte und sehr verschiedenen Dampfspannungen der einzelnen Komponenten zu beachten. Sie benötigen eine unterschiedliche Sättigungsmenge für einen bestimmten Raum. Infolgedessen ist eine verschieden lange Zeit notwendig, bis über den einzelnen Flüssigkeiten der Sättigungs-Dampfdruck erreicht ist. Das hieße aber, daß von den im Filterpapier aufsteigenden Lösungsmitteln beispielsweise am Anfang eine Komponente noch wegdampfen kann, eine andere aber nicht mehr, was zu einer dauernden Veränderung des Entwickler-Gemisches und zu einer ständigen unterschiedlichen Trennwirkung führen würde.

Dieser Nachteil läßt sich auch durch vorherige Sättigung des Behälters, in dem dann die Filterpapiere zur Entwicklung kommen — abgesehen von der Umständlichkeit — nur zum Teil ausgleichen, da schon durch das Öffnen und Schließen Unregelmäßigkeiten in der Dampfphase auftreten können. Die üblichen Chromatographie-Kästen aus Holz sind — anscheinend wegen seiner Aufnahmefähigkeit für bestimmte Lösungsmittel — überhaupt nicht geeignet.

Ein Ausweg, der noch aus anderen Gründen gewählt wurde (s. unten), ist der, daß der Raum, in dem sich das Filterpapier mit dem aufgetragenen Extrakt befindet, evakuiert und dann erst das Entwickler-Gemisch, in welches das Papier eintaucht, zugegeben wird. Eine Dampfsättigung muß sich in kurzer Zeit einstellen.

Wenn bei der Chromatographie größere Quantitäten der Blattpigmente verwendet werden, ist leicht einzusehen, daß eventuell in der Pflanze vorkommende geringe Mengen von Farbstoffen ebenfalls mit sichtbar werden. Mit Recht kann man aber die Herkunft solch schwacher Farbzonen aus dem Blatt anzweifeln und sie einfach als Kunstprodukte abtun, die bei dem Analysengang aus den üblichen Pigmenten entstehen. Es müssen deshalb alle Vorkehrungen getroffen werden, um Fehlerquellen auszuschalten:

Die Lichtempfindlichkeit der Pigmente fällt nicht ins Gewicht, wenn auf eine sorgfältige Abdunkelung während des Analysenganges geachtet wird. Auf die Sauerstoffempfindlichkeit ist in diesem Zusammenhang aber ein besonderes Augenmerk zu richten, da durch die feine Verteilung der Farbstoffe an der Oberfläche des Papieres eine innige Berührung mit der Luft und damit dem Sauerstoff gegeben ist. Eine Stickstoffatmosphäre würde hier Abhilfe schaffen, aber gleichzeitig den Aufbau der Entwickler-Dampf-Phasen stören. Außerdem ist eine Füllung des Chromatographiekastens nicht ohne Schwierigkeiten durchzuführen. — Eine Lösung wäre die schon oben für günstig erachtete Evakuierung. Die dann noch vorhandenen Spuren von Sauerstoff können keine bedeutenden Farbstoffveränderungen mehr bewirken.

Nun müssen wir uns noch einem Problem zuwenden, das durch die Art der Chromatographie aufgeworfen wird. Die Trennung der lipoidlöslichen Blatt-Pigmente ist hinreichend gut nur mit der Adsorptionschromatographie möglich. Wir haben es hier also nicht wie bei der Verteilungs-Chromatographie mit einer Entmischung von Stoffen zu tun, die innerhalb zweier Phasen verschieden löslich sind, sondern um eine reine Anlagerung der gelösten Farbstoffe an die Moleküle des Adsorbens, in unserem Falle des Filterpapieres. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes läßt sich dabei nicht als Spezifikum werten, sondern — und das ist der große Unterschied zur Verteilungs-Chromatographie — hängt ab von seiner Konzentration. Je höher diese ist, desto weniger Adsorptionspunkte am Papier sind frei, und desto schneller wandert der Stoff weiter. Ungleichmäßigkeiten bei der Auftragung des Farbstoff-Extraktes machen sich nach erfolgter Trennung in einer Zackenbildung der Farbstoffzonen bemerkbar. Um dies zu vermeiden, kann die Extraktauftragung durch eine sehr gleichmäßig hin- und herstreichende Pipette geschehen. Soll diese jedoch ebenfalls im evakuierten

Raum erfolgen, so ist die Auftragung auf die rotierende Filterpapierwalze methodisch leichter durchzuführen.

Aus all diesen Überlegungen heraus wurde die Papierchromatographie der Blatt-Pigmente folgendermaßen durchgeführt:

2. Die technischen Einzelheiten der Apparatur[1]

Ein Glascylinder (Höhe 67 cm, Dicke 1 cm, ⌀ 30 cm), von zwei durch Zugstangen verbundenen Aluminium-Platten (Dicke 1 cm) abgeschlossen, bildet den vakuumfesten Raum für die Chromatographie, die darin aufsteigend auf Filter-

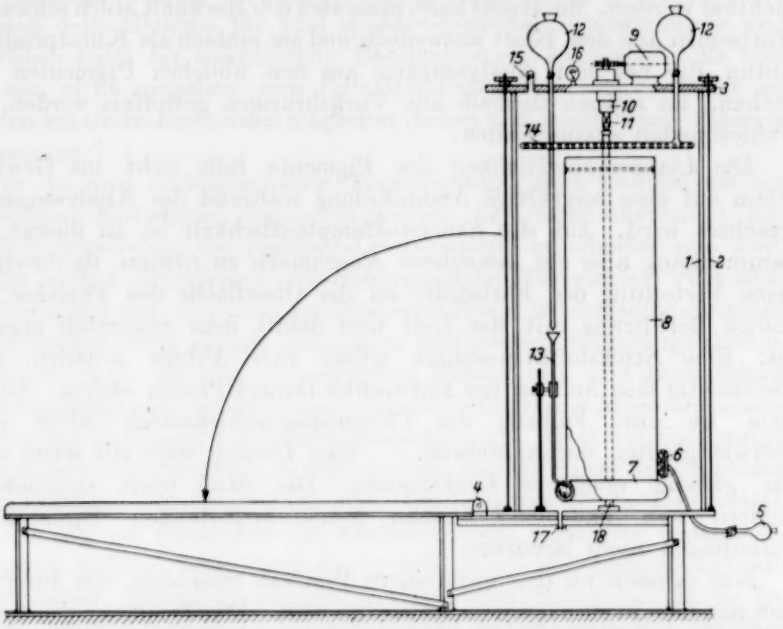


Abb. 2. Apparatur zur papierchromatographischen Trennung der Chloroplastenfarbstoffe. *1* Glascylinder; *2* Zugstangen; *3* Aluminiumplatte, abnehmbar; *4* Drehachse; *5* Behälter für Pigmentextrakt; *6* Düse zur Auftragung; *7* Cu-Rohr, Behälter für Entwicklergemisch; *8* Filterpapier-Cylinder; *9* Elektromotor mit Untersetzungsgetrieb; *10* oberes Lager mit Sperre für Lufteintritt; *11* Kupplung der Antriebswelle; *12* Behälter für Entwicklergemisch; *13* Zuleitungsrohr; *14* Sprühring; *15* Absaugstutzen; *16* Vakumeter; *17* Ablaufventil; *18* unteres Lager

papier der Fa. Schleicher & Schüll Nr. 2071 (650 g pro Quadratmeter) durchgeführt wird (s. Abb. 2).

Die Abdichtung zwischen Glas und Aluminium besorgen Ringe aus Gummischnur, die immer wieder erneuert werden, da sie bei Berührung mit den organischen Lösungsmitteln stark quellen (Kunststoff wie z. B. Perlon ist zu wenig anschmiegsam, um vollkommene Dichtigkeit zu garantieren). Dort wo Glasröhrchen durch die Metallplatte geführt werden mußten, erfolgte die Abdichtung mit einer Masse aus Mennige + Glycerin.

[1] Herrn Oberwerkmeister FEHLNER, der die Apparaturen in der Institutswerkstätte hergestellt hat, möchte ich ganz besonders danken. Ferner danke ich Herrn Institutsphotographen E. KRAUSE für die Anfertigung der Bilder.

In das Innere dieser Kammer stellt man den Filterpapier-Cylinder mit seiner Halterung. Diese besteht aus einem kreisförmigen Kupferrohr, das mit einem nach oben gerichteten Schlitz zur Aufnahme des Filterpapieres, gleichzeitig aber auch zur Aufnahme des Entwicklergemisches dient.

Eine gewisse Festigkeit des Papiercylinders wird weiter durch Spangen erreicht, die daneben eine Berührung des Papieres in der „Überlappungszone" und damit ein schnelleres, capillares Hochsteigen der Flüssigkeit an dieser Stelle vermeiden sollen. Das Übereinanderliegen der Filterpapier-Enden soll einen farbstoffreien Teil bringen, wie er bei dem späteren Herauslösen der Farbstoffe wünschenswert ist.

Auf dem Deckel sind die beiden Behälter für das Entwicklergemisch und der Elektromotor, der eine gleichmäßige Drehung der Papierwalze besorgt, angebracht. Die Achse wird dabei vakuumdicht durch die Aluminiumplatte durchgeführt.

Die Düse für die Auftragung des Extraktes schleift unter gelindem Druck auf dem Papier. Die beiden seitlichen Rollen sollen einen immer gleichbleibenden Auflagewinkel der Düse und damit gleiche Ausflußgeschwindigkeit sichern.

3. Der Analysenvorgang

2—3 g Pflanzenmasse werden im Multimix ungefähr 2 min mit 50 cm^3 HCl-freiem Chloroform zerkleinert. Die Lösung wird dann durch eine Nutsche filtriert, die zur Trocknung eine Schicht Na_2SO_4 enthält.

Nochmaliges Extrahieren der Pflanzenreste mit 50 cm^3 Chloroform im Mix und nach dem Abnutschen Vereinigung der Lösungen. Anschließend wird im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) bis auf einige Kubikzentimeter eingeengt (ungefähr eine $^3/_4$ Stunde); dabei befindet sich die Saugflasche auf einer Schüttelmaschine, damit sich an der Glaswand keine „Ränder" von Farbstoffen bilden können. Hydrophile organische Lösungsmittel sind für den Auszug nicht so gut geeignet, da sie zuviel Wasser mit aufnehmen. Beim Eindicken einer Methanol-Lösung ist eine Ausflockung von Farbstoffpartikeln zu beobachten. Benzinartige Lösungsmittel kommen wegen ihrer schlechten Aufnahmefähigkeit für die Pigmente und wegen ihrer langsamen Verdampfung nicht in Frage.

Der Extrakt wird bei waagrechter Stellung des Cylinders in das Gefäß 5 gegeben und dann langsam auf die rotierende Papierwalze laufen gelassen.

Mit etwas reinem Lösungsmittel spült man nach. Der Cylinder wird dabei nur mäßig evakuiert, damit die Lösung beim Austritt aus der Düse nicht zu sieden beginnt und umherspritzt. Dann evakuiert man so lange, bis der einige Zentimeter breite Farbstoff-Streifen vollkommen trocken ist (etwa 20 min), und klemmt dann zwischen Apparat und Pumpe ab.

Bei lotrecht stehendem Cylinder wird jetzt in die Behälter auf dem Deckel des Apparates Entwickler-Flüssigkeit gegeben (Zusammensetzung s. unten) und aus dem einen Gefäß werden etwa 150 cm^3 in das Kupferrohr geleitet, in welchem das Filterpapier steht. Aus dem anderen Gefäß läßt man 200 cm^3 in den Sprühring laufen, von dem aus

das Gemisch an der Glaswand herabläuft (s. Abb. 2). Dadurch wird in dem evakuierten Raum eine sofortige Dampfsättigung erreicht.

Das im Papier hochsteigende Trennungsgemisch hat etwa nach 24 Stunden den oberen Rand erreicht.

Nun wird der Deckel abgehoben, das noch nasse Filterpapier herausgenommen, gegen eine leuchtende Glasfläche gehalten (Fenster) und die einzelnen Farbstoffzonen mit einem Bleistift schnell markiert. Die weitere Aufteilung richtet sich nach dem Verwendungszweck.

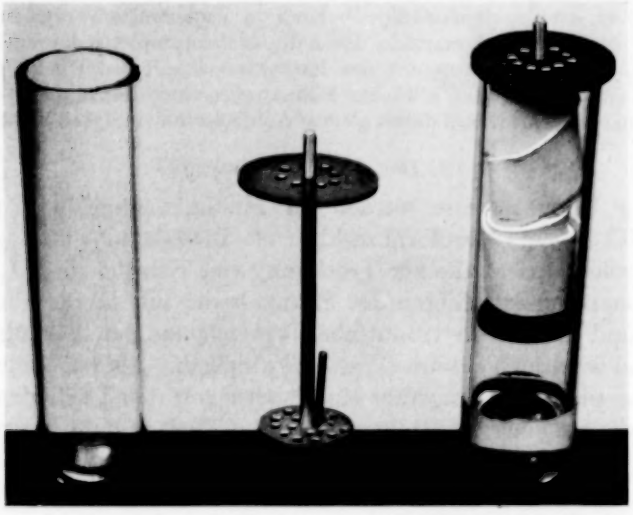


Abb. 3. Vorrichtung zum Eluieren der Blattfarbstoffe aus dem Filterpapier

Für eine *spektroskopische Bestimmung* werden die interessierenden Farbstoffzonen sofort herausgeschnitten und in einer Saugflasche unter Evakuieren getrocknet. Dann tränkt man die Streifen mit dem Lösungsmittel, in dem die Untersuchung stattfinden soll, und zentrifugiert. Die dazu benützte Vorrichtung zeigt Abb. 3.

Ein genügend großer Teil des Farbstoffes wird dabei aus dem Papier herausgelöst und sammelt sich in ziemlicher Konzentration im Zentrifugenglas an. Damit kann ohne weiteres ein Absorptionsspektrum aufgenommen und der Stoff identifiziert werden.

Zur *quantitativen Bestimmung* der einzelnen Farbstoffe schneidet man sämtliche Streifen heraus, taucht diese mit dem farblosen Ende in eine Küvette mit einem gut wirkenden Lösungsmittel wie etwa Aceton, Chloroform oder (für die Carotine) Benzin, fängt dann am hängenden unteren Ende des Streifens das nun langsam durch das Papier gewanderte Lösungsmittel mit dem vollständig herausgewaschenen Farbstoff auf (der umgebende Raum muß dabei selbstverständlich

dampfgesättigt sein) und füllt je nach Konzentration zu einer gewissen Marke auf.

Die Messung der Extinktion und damit die Mengenbestimmung erfolgt wie bei der Säulenchromatographie (s. oben) im lichtelektrischen Kolorimeter nach LANGE.

Die verhältnismäßig großen Farbstoffmengen, mit denen bei der gesamten Analyse gearbeitet wird, verringern die methodisch bedingten Fehler.

4. Die Zusammensetzung des Entwickler-Gemisches

Benzin nimmt als Entwickler beim Aufsteigen im Papier (s. auch Abb. 4) nur die Carotine (an der Lösungsmittelfront) mit, während die anderen Farbstoffe an der Auftragungsstelle sitzen bleiben.

Wird *Petroläther* als Entwickler verwendet, so wandern die Pigmente in einer schon erkennbaren Reihenfolge: Chlorophyll b ganz unten, dann Chlorophyll a, Xanthophyll etwas weiter oben. Ihre Trennung ist aber unvollkommen.

Aceton wiederum hebt die Adsorptionsfähigkeit des Papiers für alle Pigmente auf, die dann noch vereinigt am oberen Rande des Papieres erscheinen. Als Zugabe zu Benzin bewirkt es dagegen bereits eine Isolierung der aufsteigenden Pigmente, besonders von Neoxanthin und Chlorophyll b am unteren Rande.

Durch *Benzol* wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Xanthophylle im Verhältnis zu den Chlorophyllen beschleunigt (Carotin wieder an der Front), aber doch nicht so stark, daß das Neoxanthin letztlich oberhalb der Chlorophylle lokalisiert wäre.

Chloroform wirkt wie Aceton. Verwendet man jedoch ein Gemisch von etwas Chloroform und Benzin, so tritt im Vergleich zu reinem Benzin schnelleres Wandern der Xanthophylle und besonders der Chlorophylle ein, so daß das Neoxanthin unten frei wird.

Methanol und *Isopropanol* heben die Adsorptionskräfte des Papieres für alle Farbstoffe weitgehend auf, am wenigsten jedoch für das Carotin, das in diesem Falle im Verhältnis zu den anderen Pigmenten am weitesten unten erscheint. In Verbindung mit Benzin ist eine relative Beschleunigung der Chlorophylle zu beobachten, die dann von den Xanthophyllen das Violaxanthin und Lutein überlagern, dafür aber die am Papier unterhalb lokalisierten Farbstoffe sichtbar werden lassen.

Äther eignet sich, wegen seiner zu großen Lösungskraft und seiner Tendenz Peroxyde zu bilden, nicht.

Durch die verschiedenen Lösungsmittel läßt sich also die Adsorptionsfähigkeit des Filterpapiers für die einzelnen Farbstoffe und Farbstoffgruppen und damit ihre Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussen.

Eine ausreichend gute Trennung gelingt mit einem Gemisch folgender Zusammensetzung (in Volumeneinheiten):

Benzin (Siedebereich 100—140° C)	50
Benzol	35
Chloroform	10
Aceton	0,5
Isopropanol	0,17

Die Zusammensetzung des Entwicklers, und damit in gewissen Grenzen auch die Lokalisation der Farbstoffzonen und ihre Entfernung

voneinander, läßt sich je nach Verwendungszweck des Chromatogramms abwandeln.

Die hier angegebenen Trennwirkungen sind jedoch nur bei sorgfältig getrocknetem Filterpapier (50° C) zu erwarten.

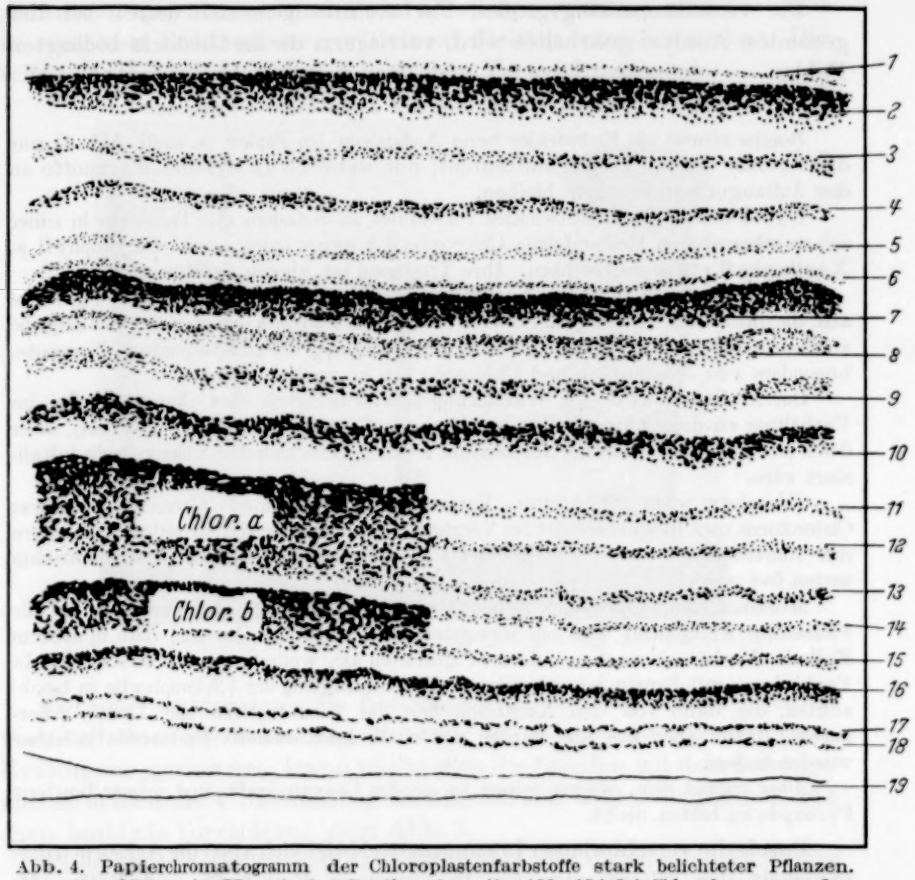


Abb. 4. Papierchromatogramm der Chloroplastenfarbstoffe stark belichteter Pflanzen. *1* c_{fl} (λ_{max} 271 mμ in Hexan); *2* β-Carotin; *3* c_{14} (λ_m 455, 484,5 i. Chlorof., zum großen Teil β-Carotin-di-epoxyd); *4* Phaeophytin a; *5* x_6 (λ_m 411, 466 i. Äthanol); *6* Phaeophytin b; *7* Lutein; *8* Zeaxanthin; *9* Xanthophyllepoxyd; *10* Violaxanthin; *11* Chrysanthemaxanthin; *12* Flavoxanthin; *13* x_1 (λ_{max} 431, 466 in Äthanol); *14* x_2 (λ_{max} 430,5, 468 in Äthanol); *15* x_3 (λ_{max} 450 in Äthanol); *16* Neoxanthin; *17* Phaeophorbid a; *18* Phaeophorbid b; *19* Auftragung (Chlorophyllide)

5. Die gefundenen lipoidlöslichen Farbstoffe der grünen Pflanzen (Abb. 4 und 5)

Die im nachfolgenden angeführten Absorptions-Maxima der Pigmente sind im BECKMAN-Spektralphotometer direkt aus den Lösungen der

eluierten Farbstoffe ohne weitere chromatographische Reinigung bestimmt worden.

a) Die Carotine („c"). c_{II} ist eine farblose, weißlich fluorescierende Substanz, die sich in geringen Mengen an der Lösungsmittel-Front

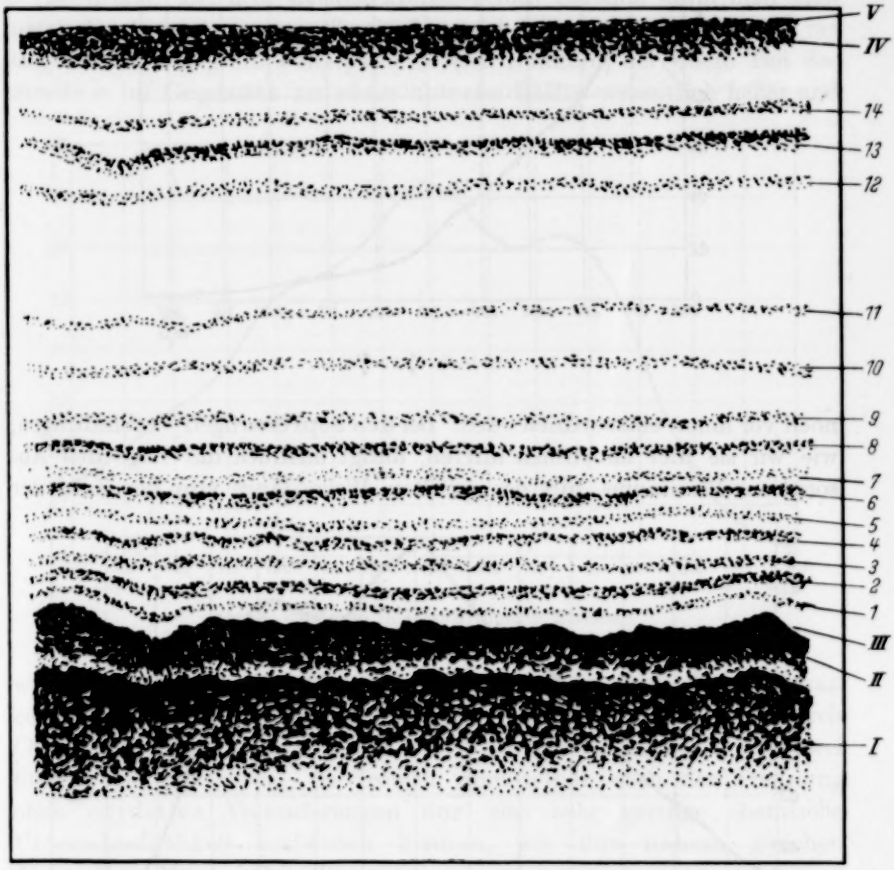


Abb. 5. Papierchromatogramm der Chloroplastenfarbstoffe stark belichteter Pflanzen (Entwickler Benzin). *V* c_{II}; *IV* β-Carotin; *14* gelbe Zone; *13* orange Zone (β-Carotin-di-epoxyd ?); *12* gelbe Zone; *11* blaß-gelbe Zone; *10* gelbe Zone; *9* gelb-orange Zone; *8* orange Zone; *7* gelbe Zone; *6* orange Zone; *5* gelbe Zone; *4* gelb-orange Zone; *3* gelb-orange Zone; *2* orange Zone; *1* gelbe Zone; *III* Phaeophytin a; *II* Xanthophylle; *I* Chlorophylle

unmittelbar oberhalb des Carotins befindet (s. Abb. 4). Das Absorptions-Maximum liegt bei 271 mμ in Hexan (bei noch kleineren Wellenlängen konnte nicht gemessen werden, da das Hexan unterhalb 263 mμ selbst zu stark absorbiert; s. Abb. 6). Die sehr gute Löslichkeit der Substanz in Benzin — wie die Lage im Chromatogramm beweist — und ihr

Absorptions-Maximum im kurzwelligen UV läßt auf einen Kohlenwasserstoff schließen, der im Vergleich zu den bekannten Carotinoid-Vorstufen eine kürzere Kohlenstoffkette aufweist und damit in der Biogenese

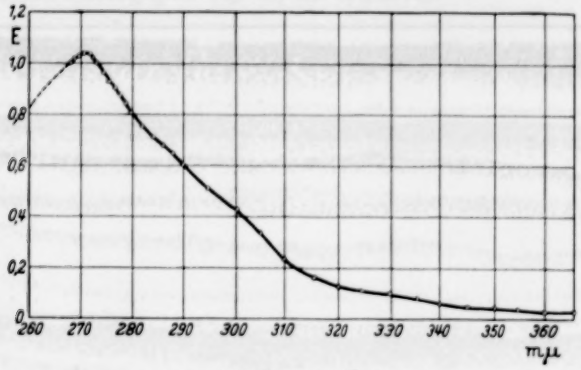


Abb. 6. c_{II} in Hexan

noch vor ihnen einzuordnen wäre. Bei den isoprenartigen Verbindungen, wie wir sie hier annehmen dürfen, hängt nämlich die Lage des Absorptions-Maximums mit der größten Wellenlänge von der Zahl der

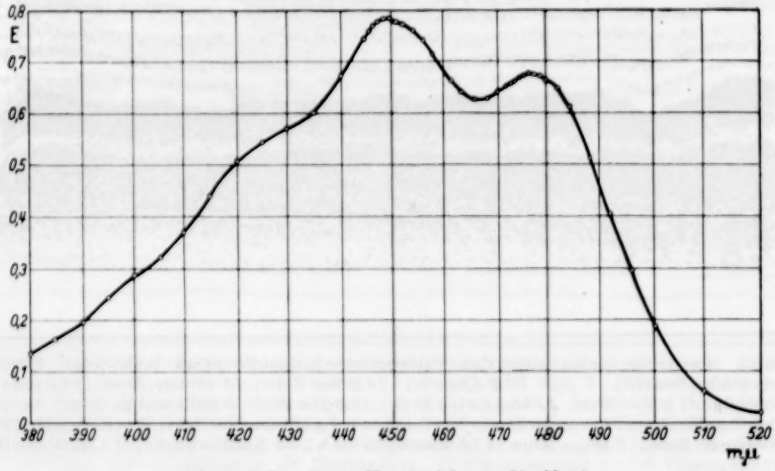


Abb. 7. β-Carotin in Hexan (oberer Streifen)

Doppelbindungen ab (PORTER 1953) und damit von der Länge der Moleküle. Die ebenfalls farblosen und fluorescierenden Vorstufen Phytoen und Phytofluen haben Maxima bei größeren Wellenlängen:

λ_{max} 275, 285, 296 bzw. λ_{max} 332, 348, 367.

Vielleicht ist c_μ mit einer von ENY (1953) im Milchsaft von *Hevea*-Pflanzen gefundenen farblosen, fluorescierenden Verbindung identisch, die aus der Carotin-Fraktion gewonnen wurde, und die ein Absorptions-Maximum von 270 und 230 mμ aufweist.

β-Carotin: Bei dem breiten kräftig-gelben Streifen kann man mitunter die Andeutung einer Zweiteilung erkennen. Tatsächlich wird bei längerer Lagerung des Filterpapieres (im Dunkeln) der obere Teil des Streifens im Gegensatz zu seiner unteren Hälfte wesentlich heller und

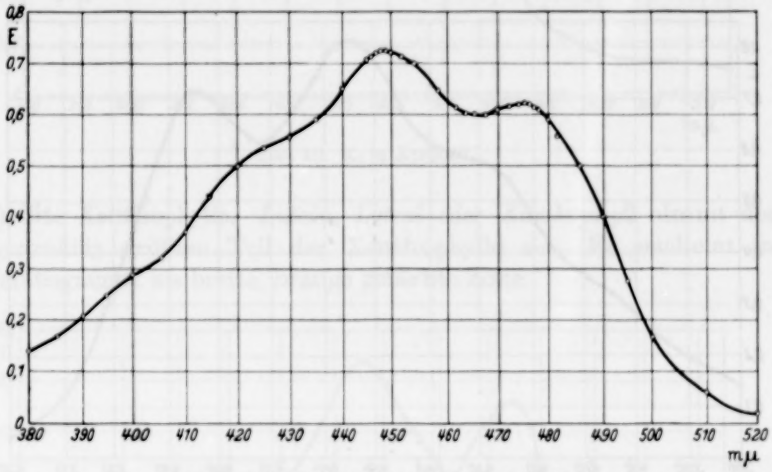


Abb. 8. β-Carotin in Hexan (unterer Streifen)

wird schließlich fast farblos. Er läßt sich dann auch durch Hexan oder Benzin nicht mehr herauslösen, sondern nur noch durch Chloroform. Das deutet darauf hin, daß wir es eigentlich mit zwei Stoffen zu tun haben, die freilich unmittelbar nach der Trennung ohne oxydative Veränderungen nur eine sehr geringe chemische Unterschiedlichkeit aufweisen können, wie ihre nahezu gleichen Absorptions-Maxima kundtun:

oberer Teil in Hexan λ_{max} 450, 477 mμ (s. Abb. 7)

unterer Teil in Hexan λ_{max} 449, 475 mμ (s. Abb. 8)

Zum Vergleich die aus der Literatur bekannten Maxima für β-Carotin in n-Hexan:

mμ	451	482	aus KARRER	(1948)
	450	480	SMAKULA	(1934)
	452	478	WALD	(unveröffentlicht)
	450	477	BEADLE u. ZSCHEILE	(1942)

c_{14} stellt sich als eine schwach gelb gefärbte Zone dar, die sich mit Hexan schlecht, mit Chloroform besser eluieren läßt. Die Absorptions-Maxima in Chloroform betragen:

$$\lambda_{max}\ 455,\ 484.5\ m\mu\ \text{(s. Abb. 9)}.$$

Danach würde es sich um das β-Carotin-di-epoxyd handeln (KARRER 1948: λ_{max} 456, 484). Daß aber noch weitere Farbstoffe darin enthalten sein müssen, wird bewiesen, wenn bei der Chromatographie als Entwickler nur Benzin verwendet wird. Es bleiben dann die Chlorophylle und

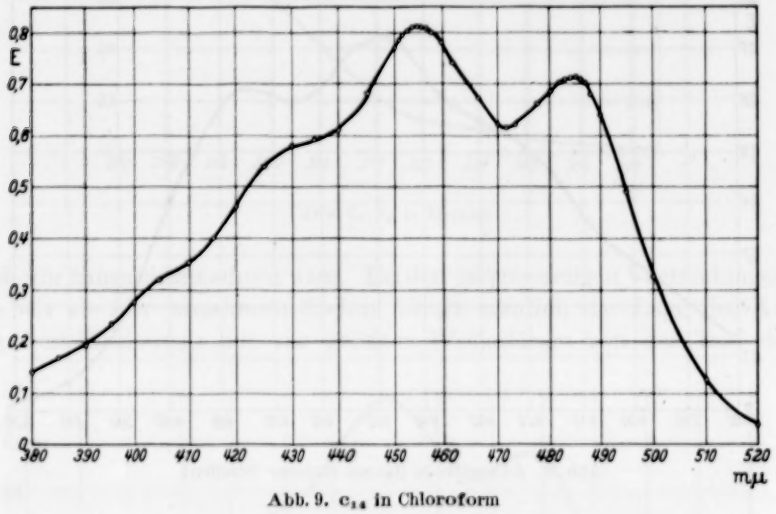


Abb. 9. c_{14} in Chloroform

Xanthophylle einschließlich dem Phaeophytin a ziemlich nahe an der Auftragungszone sitzen, während das β-Carotin an der Lösungsmittelfront nach oben geschoben wird. Im Raum dazwischen lassen sich, wenn stark belichtete Pflanzen (z. B. 4 Tage unter Starklicht gehaltene Haferpflanzen) oder alte Pflanzen zur Analyse verwendet wurden (was für das Auftreten von c_{14} ebenso notwendig ist), bis zu 14 schwach-gelbe Zonen unterscheiden (s. Abb. 5). Es ist anzunehmen, daß der im Chromatogramm mit c_{14} bezeichnete Streifen besser aufgeteilt werden konnte und die vielen Carotin-Isomeren dadurch sichtbar wurden. Für die säulenchromatographische Trennung der Blatt-Farbstoffe ist das Vorhandensein dieser gelben Pigmente insoferne nicht sehr günstig, als sie am Adsorbens kaum sichtbar sind und deshalb einmal mit aus der Säule heraustropfen und so in die Carotin-Fraktion gelangen können, oder in der Säule verbleiben und dann zu den Xanthophyllen gezählt werden können. Glücklicherweise sind sie aber mengenmäßig so gering, daß sie nicht sehr stark ins Gewicht fallen.

X_0 ist ein gelb gefärbtes Carotinoid, das ebenfalls nur bei stark bestrahlten Pflanzen vorkommt. Wie seine Absorptions-Maxima zeigen, ist eine Ähnlichkeit mit bekannten Verbindungen nicht vorhanden.

in Äthanol λ_{max} 411, 466 mμ (s. Abb. 10).

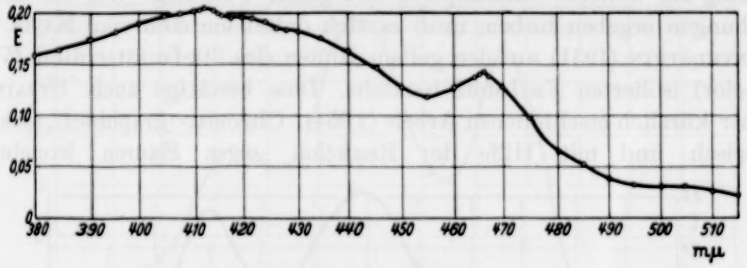


Abb. 10. X_0 in Äthanol

b) Die Xanthophylle. *Lutein, Luteol oder Xanthophyll* nimmt den mengenmäßig größten Teil der Xanthophylle ein. Es erscheint im Chromatogramm als breite, orange gefärbte Zone.

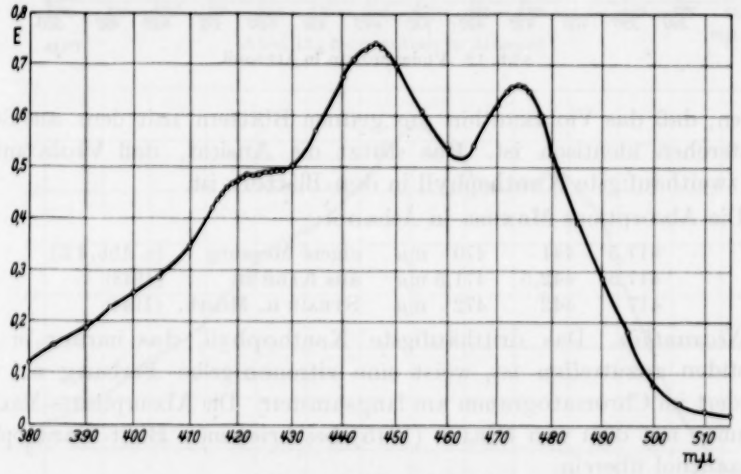


Abb. 11. Lutein in Äthanol

Die Absorptions-Maxima in Äthanol:

422	446	474	mμ	eigene Messung	(s. Abb. 11)
420	446,5	476	mμ	KARRER	(1948)
—	451	473	mμ	STRAIN	(1938)
421	450	480	mμ	KUHN u. Mitarb.	(1930)
424	446,5	477,5	mμ	ZSCHEILE u. Mitarb.	(1942)
—	446	476	mμ	aus STRAIN	(1945)

Die Unterschiede lassen sich hier durch das Vorhandensein des Zeaxanthins erklären, das in wechselnden Mengen das Lutein begleitet und von ihm nicht leicht zu trennen ist.

Violaxanthin. Neben dem Lutein findet sich in grünen Pflanzen ständig ein weiteres Xanthophyll mit gelber Färbung. Wie die Untersuchungen ergeben haben, muß es sich dabei um den von KUHN und WINTERSTEIN (1931) aus den gelben Blüten des Stiefmütterchens (Viola tricolor) isolierten Farbstoff handeln. Dies bestätigt auch STRAIN in seiner kürzlich erschienenen Arbeit (1954). Chromatographisch, spektroskopisch und mit Hilfe der Reaktion gegen Säuren konnte er

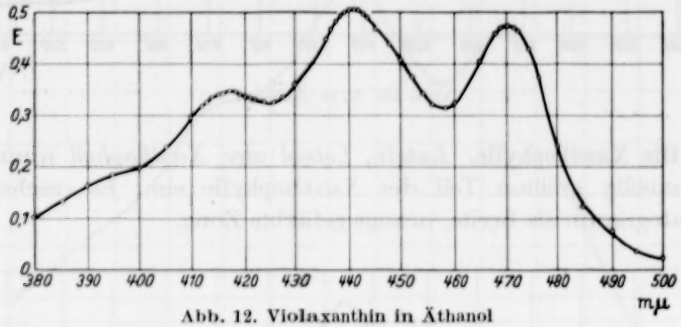


Abb. 12. Violaxanthin in Äthanol

zeigen, daß das Violaxanthin aus grünen Blättern mit dem aus Stiefmütterchen identisch ist. Das stützt die Ansicht, daß Violaxanthin das zweithäufigste Xanthophyll in den Blättern ist.

Die Absorptions-Maxima in Äthanol:

417,5	441	470 mμ	eigene Messung	(s. Abb. 12)
417,5	442,5	471,5 mμ	aus KARRER	(1948)
417	442	472 mμ	STRAIN u. Mitarb.	(1944)

Neoxanthin. Das dritthäufigste Xanthophyll, das immer in den Plastiden anzutreffen ist, weist eine zitronen-gelbe Färbung auf und wandert im Chromatogramm am langsamsten. Die Absorptions-Maxima stimmen mit dem von STRAIN (1945) beschriebenen Blatt-Xanthophyll Neoxanthol überein.

In Äthanol:

λ_{max}	414	437	466 mμ	eigene Messung	(s. Abb. 13)
	—	437	467 mμ	aus STRAIN	(1945)

Die Strukturformel ist noch nicht bekannt.

Zeaxanthin. Ursprünglich aus Mais isoliert, woher der rötlich-gelbe Farbstoff auch seinen Namen hat, findet man ihn aber auch in sehr wechselnden Mengen in anderen grünen Pflanzen. Er tritt immer nur in den Teilen auf, die stark dem Licht ausgesetzt waren.

In Äthanol:

λ_{max}	451,5	478 mμ	eigene Messung (s. Abb. 14)
	452	479 mμ	ZSCHEILE u. a. (1942)
	452	479 mμ	STRAIN u. a. (1944)
	423,5 451	483 mμ	aus KARRER (1948)

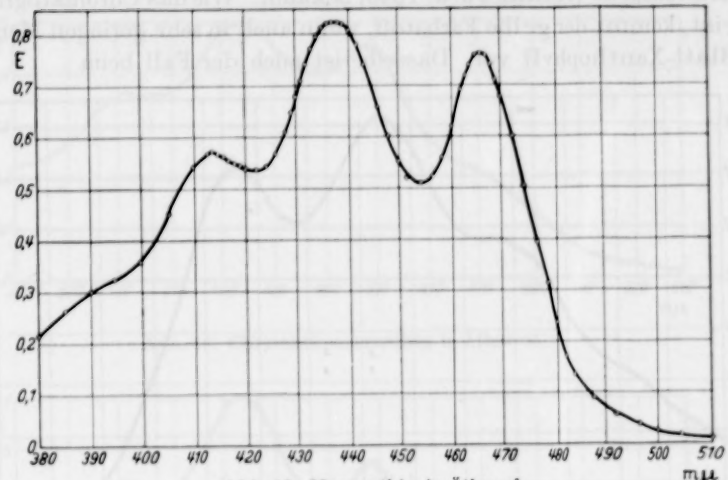


Abb. 13. Neoxanthin in Äthanol

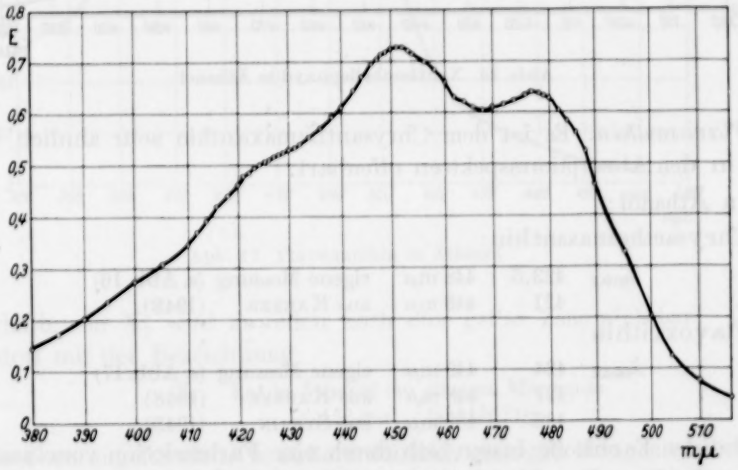


Abb. 14. Zeaxanthin in Äthanol

Xanthophyllepoxyd ist in Blüten sehr stark verbreitet, kommt aber, wie die Untersuchungen zeigen, auch in grünen Blättern vor, besonders nach starkem Lichtgenuß. Die hellgelbe Substanz hat folgende Maxima in Äthanol:

λ_{max}	425	446	474 mμ	eigene Messung	(s. Abb. 15)
	—	445	473 mμ	KARRER	(1948)

Chrysanthemaxanthin war bislang nur aus Blütenblättern von *Aster levigatus* (KARRER u. a. 1943), *Sarothamnus scoparius* (KARRER u. a. 1948) und *Ranunculus* (KARRER u. a. 1945) bekannt. Wie das Chromatogramm beweist, kommt der gelbe Farbstoff, wenn auch in sehr geringen Mengen, als Blatt-Xanthophyll vor. Dasselbe ist auch der Fall beim

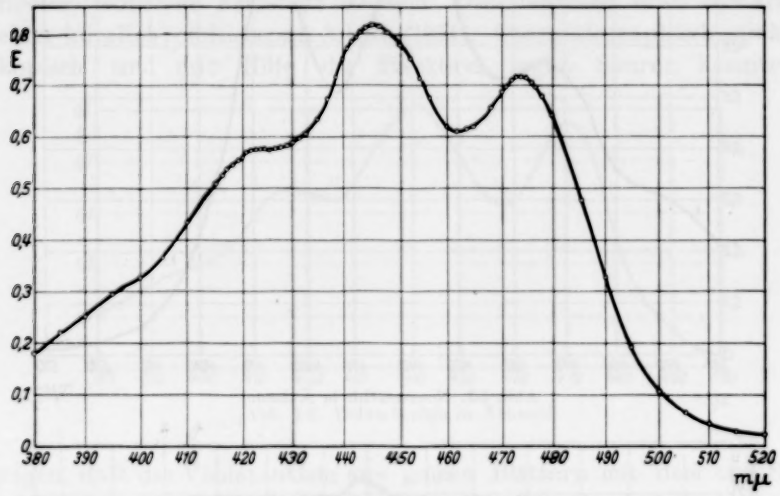


Abb. 15. Xanthophyllepoxyd in Äthanol

Flavoxanthin. Es ist dem Chrysanthemaxanthin sehr ähnlich, was sich in den Absorptionsspektren offenbart.

In Äthanol:

Chrysanthemaxanthin:

λ_{max}	423,5	448 mμ	eigene Messung	(s. Abb. 16)
	421	448 mμ	aus KARRER	(1948)

Flavoxanthin:

λ_{max}	424	449 mμ	eigene Messung	(s. Abb. 17)
	421	448 mμ	aus KARRER	(1948)
	422	452 mμ	aus STRAIN	(1945)

Die beiden Farbstoffe lassen sich durch eine Farbreaktion voneinander unterscheiden: Das Chrysanthemaxanthin in Äther gelöst ruft mit konzentrierter HCl, im Gegensatz zu Flavoxanthin, keine Blaufärbung hervor. Von den beiden in Frage kommenden Streifen im Chromatogramm färbt sich der untere blau, ist also Flavoxanthin.

Es läßt sich im Chromatogramm noch ein weiteres gelbliches Farbstoffpaar feststellen, das ebenfalls nur in sehr geringen Mengen

vorkommt. Die beiden bisher unbekannten Xanthophylle („X") haben folgende Absorptions-Maxima in Äthanol:

X_1 431 466 mμ (s. Abb. 18)
X_2 430,5 468 mμ (s. Abb. 19).

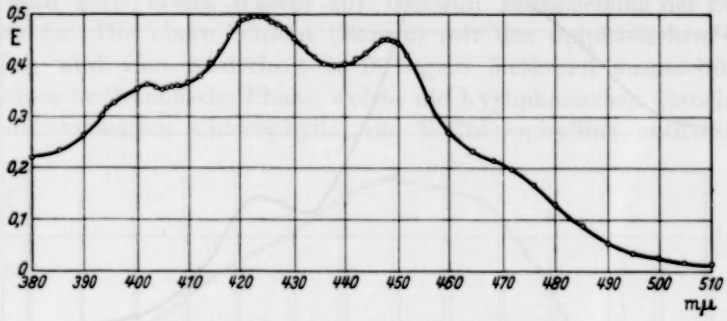


Abb. 16. Chrysanthemaxanthin in Äthanol

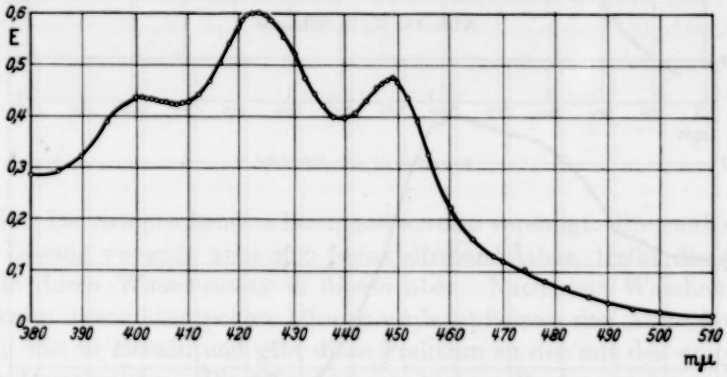


Abb. 17. Flavoxanthin in Äthanol

Unterhalb von X_2 wird zuweilen noch eine gelbe Zone sichtbar. Der Farbstoff mit der Bezeichnung

X_3 hat in Äthanol ein einziges Maximum 450 mμ (s. Abb. 20)

Die eben angeführten, in außerordentlich geringen Mengen vorkommenden Xanthophylle Chrysanthemaxanthin, Flavoxanthin, X_1, X_2, X_3 werden normalerweise, also bei Verwendung des oben angegebenen Entwicklers, von den Chlorophyllen a und b verdeckt. Sie werden jedoch sichtbar durch Verschiebung der Chlorophylle nach oben über das Violaxanthin hinaus. Dies kann durch Zugabe von Methanol zum Entwickler-Gemisch geschehen, oder aber man verseift die Chlorophylle (s. unten).

Bei der Behandlung der Xanthophylle muß noch auf die Frage eingegangen werden, inwieweit sie mit Pflanzensäuren verestert vorkommen,

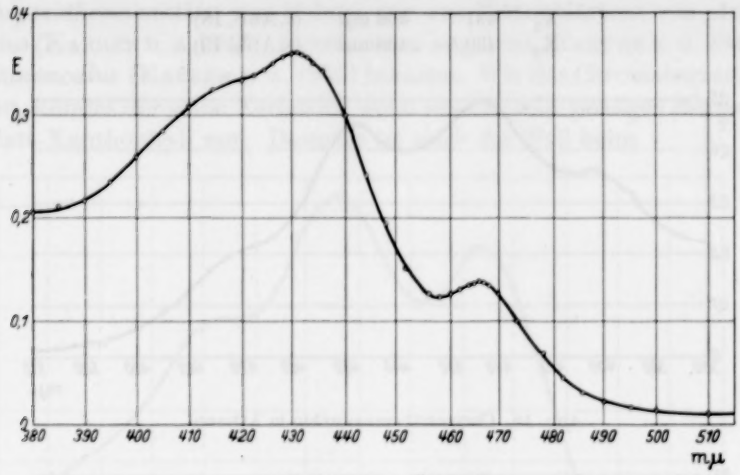


Abb. 18. X_1 in Äthanol

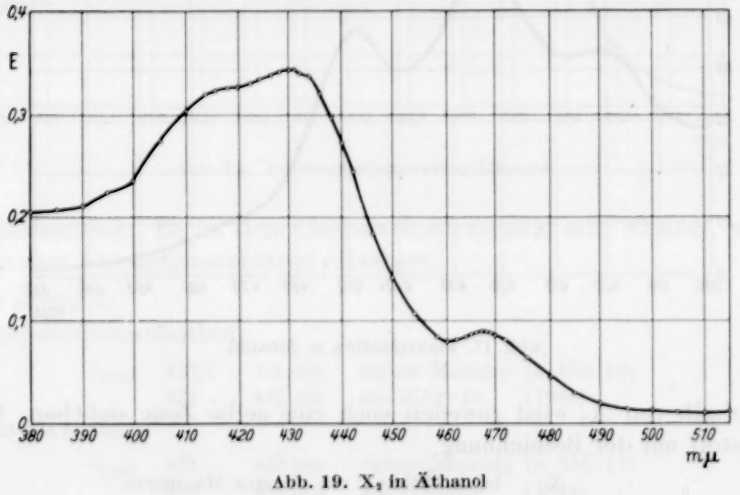


Abb. 19. X_2 in Äthanol

und welche Zone im Chromatogramm eventuell als *Farbstoffester* anzusprechen wäre.

Eine Antwort darauf kann man so finden, daß man ein „normales" Chromatogramm mit einem solchen vergleicht, bei dem der Pflanzenextrakt vorher verseift wurde. Wenn Ester vorhanden sind, so müssen im 2. Chromatogramm bestimmte Farbstoffzonen fehlen oder an anderer Stelle wieder erscheinen.

Die Verseifung wurde folgendermaßen durchgeführt: Der Farbstoffextrakt, in Benzin übergeführt (s. Kap. über Säulenchromatographie), wird mit 12%iger methanolischer KOH versetzt (nach KARRER 1948) und dann auf der Maschine einige Zeit geschüttelt. Nach der Verseifung gibt man noch etwas Wasser zur besseren Entmischung der beiden Phasen zu. Die obere Schicht (Benzin) mit den epiphasischen Carotinoiden wird nun wiederholt in 90%igem Methanol ausgeschüttelt, die untere methanolische Phase, welche die hypophasischen Carotinoide und die verseiften Chlorophylle, die K-Chlorophylline enthält, mit

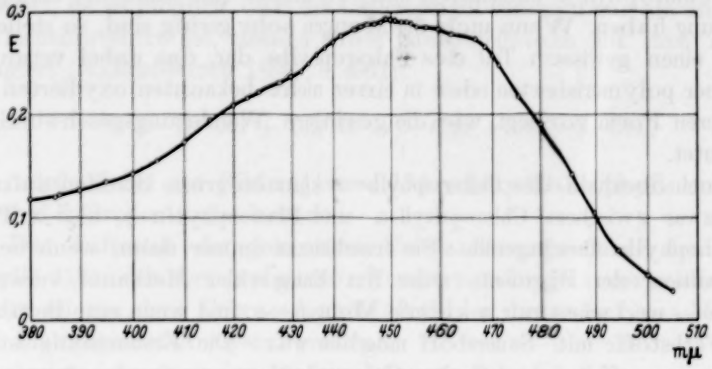


Abb. 20. X_2 in Äthanol

Benzin. Die entsprechenden Lösungen werden vereinigt. Die methanolische Lösung versetzt man mit peroxydfreiem Äther, treibt die Carotinoide durch Wasserzusatz in diesen über. Nach dem Waschen und Trocknen dieser ätherischen Lösung verdampft man den Äther im Vakuum, löst in Benzin und gibt diese Fraktion zu der mit den epiphasischen Carotinoiden. Die Chromatographie an Papier erfolgt wie beschrieben.

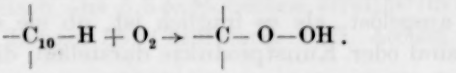
Es erweist sich nun, daß mit Ausnahme der nicht mehr vorhandenen Chlorophylle alle Farbstoffe am selben Ort und mit derselben Konzentration im Chromatogramm wieder erscheinen, daß also entweder die vorhandenen Säuregruppen der Ester bei der Chromatographie keinen größeren Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit ausüben als die jetzt durch Verseifung freigewordenen Hydroxylgruppen — was zwar unwahrscheinlich ist — oder aber, daß überhaupt keine Ester vorgelegen haben. Es scheint so zu sein, daß veresterte Phytoxanthine nur als Farbwachse in Blüten oder Früchten vorkommen wie z. B. das Helenien (Xanthophyll-di-palmitat) in Blütenblättern von *Helenium autumnale* oder Physalin (Zeaxanthin-di-palmitat) in Kelchblättern und Beeren von *Physalis*.

c) Die Chlorophylle. Über die *Chlorophylle a und b*, die wegen ihrer großen Menge in breiten Streifen im Chromatogramm vorliegen, wäre nichts Besonderes zu sagen, würden nicht unterhalb und oberhalb von ihnen weitere grüne Farbstoffzonen auftreten, zu denen sie in ursächlichem Zusammenhang stehen. Wird nämlich der Pflanzenextrakt an der Luft oder im Licht stehen gelassen, oder erfolgt die Papierchromatographie ohne Vorkehrungen gegen oxydative Einflüsse, oder ist die Raumtemperatur beim Analysengang zu hoch, so sind einige Farbstoffbänder, meist 3, zu beobachten, die den Raum zwischen den Phaeophorbiden und dem Chlorophyll a einnehmen und wie dieses eine ähnliche, blau-grüne Färbung haben. Wenn auch die Mengen sehr gering sind, so stellen sie doch einen gewissen Teil des Chlorophylls dar, das dabei vermutlich in einer polymerisierten oder in einer nicht bekannten oxydierten oder isomeren Form vorliegt, wie die geringere Wanderungsgeschwindigkeit andeutet.

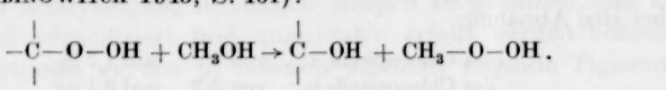
Auch oberhalb des Chlorophylls a können grüne Streifen auftreten und zwar zwischen Chlorophyll a und Phaeophytin b, also z. T. die Xanthophylle überlagernd. Sie erscheinen immer dann, wenn bei der Extraktion der Pigmente oder im Entwickler Methanol verwendet wurde — und sei es nur in kleinen Mengen —, und wenn eine Berührung der Farbstoffe mit Sauerstoff möglich war. Die Erscheinung ist bisweilen so auffallend, daß das Chlorophyll a aus 2 oder 3 einzelnen Komponenten zu bestehen scheint, also fast gleich starke, blau-grüne Streifen nebeneinander liegen. In diesem Falle handelt es sich um Allomerisationsprodukte. Man kann sie durch die MOLISCH-Phasenprobe nachweisen, bei der während der Verseifung der alkoholgelösten Chlorophylle mit methanolischer KOH kurzzeitig eine Braunfärbung der Lösung auftritt, falls die Chlorophylle noch unverändert vorgelegen haben; bleibt diese Färbung aus, hat es sich um allomerisiertes Chlorophyll gehandelt. Eine wesentlich genauere Bestimmungsmöglichkeit bietet die Messung der spektralen Absorption, wie sie von LIVINGSTON (1948) zuerst durchgeführt wurde. Die Maxima der veränderten Chlorophylle sind etwas nach kleineren Wellenlängen zu verschoben, was freilich rein äußerlich an der Färbung noch nicht in Erscheinung tritt.

Tatsächlich zeigen die Absorptionskurven dieser grünen Farbstoffkomponenten eine deutliche Verschiebung des Hauptmaximums, das im unveränderten Chlorophyll a um 665 mμ in Äthanol gemessen wurde (gute Übereinstimmung mit den Messungen von EGLE 1939, in Äthanol: 665,5 mμ), während die Zonen oberhalb des eigentlichen Chlorophylls a bereits ein kürzerwelliges Maximum mit 662 mμ bzw. 657 mμ aufweisen. Diese Maxima sind nicht sehr konstant und können von Mal zu Mal um mehrere mμ schwanken.

Die hauptsächliche chemische Ursache dieser sog. Allomerisation ist wahrscheinlich die Oxydation des labilen Wasserstoffatoms in Stellung 10. CONANT, DIETZ, BAILEY u. KAMERLING (1931) haben gefunden, daß dabei 1 Mol Sauerstoff pro Mol Chlorophyll verbraucht wird. FISCHER vermutete deshalb die Bildung eines Chlorophyll-Peroxydes:



Da die Allomerisation hauptsächlich bei Anwesenheit von Alkohol eintritt, ist es möglich, daß das Chlorophyll-Peroxyd nur ein unstabiles Zwischenprodukt ist, dessen eines Sauerstoffatom mit dem Alkohol reagiert (RABINOWITCH 1945, S. 461):



Es würde dabei zur Bildung eines 10-hydroxy-Chlorophylls und eines Methyl-hydroperoxydes kommen.

Das Auftreten der genannten Umwandlungsprodukte der Chlorophylle läßt sich bei geeigneten Vorsichtsmaßregeln vermeiden. Vor allem sei vor dem Gebrauch von Alkoholen, besonders von Methanol bei Blattpigment-Analysen gewarnt.

Anders ist es mit den im folgenden zu besprechenden

d) Chlorophyll-Derivaten, die z. T. schon in der Pflanze vorhanden sind, z. T. aber erst während der Extraktion durch das Ferment Chlorophyllase gebildet werden.

Phaeophytin a erscheint als graue Zone, die im UV-Licht lebhaft rot fluoresciert. In wechselnder Stärke ist sie im Chromatogramm immer vorhanden.

Strukturell ist Phaeophytin identisch mit Chlorophyll, besitzt jedoch kein Mg.

Phaeophytin b kann nur selten durch Rotfluorescenz auf dem Filterpapier nachgewiesen werden. Es findet sich dann in sehr geringen Mengen oberhalb des Luteins. Seine eigentliche Farbe ist ebenfalls grau. Es leitet sich vom Chlorophyll b ab.

Phaeophorbid a hat eine blau-grüne Färbung ähnlich dem Chlorophyll a und bildet im Chromatogramm einen sehr schmalen und wegen der geringen Menge fast nicht auffallenden Streifen.

Phaeophorbid b ist als Derivat des Chlorophylls b gelb-grün gefärbt und kommt ebenfalls nur in sehr geringen Mengen vor.

Im Gegensatz zu den Chlorophyllen haben die Phaeophorbide kein Mg und keinen Phytylrest (an dieser Stelle ist die Carboxylgruppe unverestert!).

Chlorophyllid a und Chlorophyllid b haben fast keine Wanderungsgeschwindigkeit und finden sich — wenn überhaupt — als schwach bräunliche Linie in der Zone der Pigment-Auftragung. Chemisch betrachtet stellen sie ein Chlorophyll-Molekül ohne Phytol dar, d. h. die Carboxylgruppe am Pyrrolring IV ist nicht verestert.

Die eben genannten Chlorophyll-Derivate haben insoferne eine Diskussion ausgelöst, als es fraglich ist, ob sie schon in der Pflanze vorhanden sind oder Kunstprodukte darstellen, die bei der Extraktion und dem weiteren Analysengang entstehen.

SIRONVAL (1954) hat sich mit dem Problem befaßt und die Wirkung der Chlorophyllase in 66%igem Aceton-Extrakt von Blattpigmenten in saurem Milieu (p_H 4) nach 1, 2 und 3 Stunden gemessen. Er fand dabei eine Abnahme

des Chlorophylls a	von 6	auf 1,7 μg
des Chlorophylls b	von 5,2	auf 3,1 μg
der Chlorophyllide	von 1,8	auf 0,7 μg

und eine Zunahme

der Phaeophytine	von 9	auf 11,2 μg und
der Phaeophorbide	von 0	auf 5,3 μg

Das würde einmal besagen, daß die Chlorophyllase nicht nur, wie bisher angenommen, die Bildung der Phaeophorbide aus dem Chlorophyll bewirkt, sondern dasselbe auch bei den Phaeophytinen vermag.

Zum andern läßt sich aus den Ergebnissen folgern, was für unsere Fragestellung wichtig ist, daß die Phaeophytine und Chlorophyllide, wie ihre Anwesenheit zu Beginn des Versuchs zeigt, bereits im Blatt vorhanden gewesen sein müssen.

Bei den eigenen Versuchen waren das Phaeophytin a in sichtbarer Menge, die Phaeophorbide in sehr geringen Quantitäten immer vorhanden, auch wenn kein Alkohol beim Analysengang verwendet worden war.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Chlorophyllase bei der Extraktion mit Chloroform eine besondere Aktivität entfalten konnte, da eine solche großen Teils an das Vorhandensein von Wasser mit saurem Charakter gebunden ist. Unser Lösungsmittel enthält Wasser überhaupt nicht und nimmt auch keines auf; zum anderen werden die Pflanzensäuren beim Zerkleinern der Zellen sofort mit dem zugegebenen $CaCO_3$ neutralisiert. Es wäre deshalb möglich, daß bereits im Blatt kleine Mengen dieser Derivate durch die Tätigkeit der Chlorophyllase gebildet werden. Genauere Untersuchungen darüber sind noch notwendig.

Für die Überlassung des Themas und die immerwährende Förderung und Hilfe möchte ich Herrn Professor Dr. F. BUKATSCH herzlich danken.

Zusammenfassung

I. Die Chloroplasten-Farbstoffe lassen sich zur quantitativen Bestimmung aus einem Aceton-Extrakt mit 10%iger NaCl-Lösung verlustlos in Benzin überführen und dann an einer präparierten Stärkesäule in die 6 Hauptfarbstoffe Neoxanthin, Chlorophyll b, Chlorophyll a, Violaxanthin, Lutein und Carotin aufteilen. Die Trennung wird durch ein Lösungsmittel-Gemisch aus 5 Komponenten erreicht (in Volumeneinheiten: Benzin 60, Benzol 35, Chloroform 1,25, Aceton 0,55, Isopropanol 0,06).

II. Eine neue papierchromatographische Methode gestattet es, unter besonderen Vorsichtsmaßregeln (Vakuum) die Blattpigmente nicht nur genauer in einzelne Farbstoff-Komponenten aufzuteilen, sondern sie auch in einem Analysengang in solchen Mengen zu gewinnen, daß sie spektroskopisch identifiziert und quantitativ erfaßt werden können. Mit dieser Methode wurden in höheren Pflanzen folgende Pigmente gefunden:

a) Carotine:
β-Carotin, β-Carotin-di-epoxyd, c_{fl}, 13 Isomere; X_0;

b) Xanthophylle:
Lutein, Violaxanthin, Neoxanthin, Zeaxanthin, Xanthophyllepoxyd, Chrysanthemaxanthin, Flavoxanthin, X_1, X_2, X_3;

c) Chlorophylle:
Chlorophyll a, Chlorophyll b;

d) Chlorophyll-Derivate:
Phaeophytin a, Phaeophytin b, Phaeophorbid a, Phaeophorbid b, Chlorophyllide (a und b).

Literatur

Asami, M.: On the paper chromatography of the leaf pigments. Bot. Mag. (Tokyo) **65**, 771 (1952). — Bauer, L.: Trennung der Karotinoide und Chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. Naturwiss. **39**, 88 (1952). — Beadle, B. W., and F. P. Zscheile: Studies on the carotenoids. II. The isomerization of β-carotene and relation to carotene analysis. J. of Biol. Chem. **144**, 21 (1942). — Bukatsch, F.: Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes alpiner Pflanzen. II. Z. Naturwiss. **6**, 197 (1940). — Über den Einfluß verschiedener mineralischer Ernährung. Phyton **3**, 173 (1951). — Clauss, H.: Der Blattfarbstoffgehalt in verschiedenen Licht-Dunkel-Rhythmen gezogener Keimpflanzen. Z. Bot. **42**, 215 (1954). — Comar, C. L., u. F. P. Zscheile: Spectroscopic analysis of plant extracts for chlorophyll a und b. Plant Physiol. **16**, 651 (1941). — Conant, J. B., E. M. Dietz, C. F. Bailey and S. E. Kamerling: Studies in the chlorophyll series V. J. Amer. Chem. Soc. **53**, 2383 (1931). — Conant, J. B., J. F. Hyde, W. E. Moyer and E. M. Dietz: Studies in the chlorophyll series IV. J. Amer. Chem. Soc. **53**, 359 (1931). — Douin, R.: Analyse chromatographique sur papier des pigments chlorophylliens. Rev. gén. Bot. **60**, 777 (1953). — Egle, K.: Untersuchungen über das Chlorophyll. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-Naturwiss. Kl. **1939**,

Nr 1, 19. — ENY, D. M.: Colorless polyenes in green leaves and latex. Arch. of Biochem. a. Biophysics **46**, 18 (1953). — FISCHER, H., u. H. ORTH: Die Chemie des Pyrrols. Bd. II: Pyrrolfarbstoffe. Leipzig 1940. — FISCHER, H., u. H. SEIBEL: Über Phäophorbid a, Chlorin e und Chlorophyll a. Liebigs Ann. **499**, 93 (1933). — GATTERMANN, L., u. H. WIELAND: Die Praxis des organischen Chemikers. 32. Aufl. Berlin 1947. — GOPPELSROEDER, F.: Capillaranalyse, beruhend auf Capillaritäts- und Adsorptionserscheinungen. Basel 1901. — HAGER, A.: Chloroplastenfarbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Außenfaktoren. Z. Naturforsch. **10** b, 310 (1955). — KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide aus den Blüten von Winterastern. Helvet. chim. Acta **26**, 626 (1943). — KARRER, P., u. E. JUCKER: Partialsynthese des Flavoxanthins, Chrysanthemaxanthins, Asteraxanthins, Violaxanthins. Helvet. chim. Acta **28**, 300 (1945). — Carotinoide. Basel 1948. — KUHN, H., A. WINTERSTEIN u. W. KAUFMANN: Zur Kenntnis des Physalin-Farbstoffes. (Über konjugierte Doppelbindungen.) XIII. Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1489 (1930). — KUHN, R., u. A. WINTERSTEIN: Viola-Xanthin, das Xanthophyll des gelben Stiefmütterchens (Viola tricolor). Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 326 (1931). — LIND, E. F., H. C. LANE and S. GLEASON: Partial separation of the plastid pigments by paper chromatography. Plant Physiology **28**, 325 (1953). — LIVINGSTON, R. u. a.: First annual report on ONR project 059028, 1948. — MANNING, W. M., u. H. H. STRAIN: Chlorophyll d, a green pigment of red algae. J. of Biol. Chem. **151**, 1 (1943). — NAGEL, W.: Über die Blattpigmente des Tabaks. Bot. Archiv **40**, 1 (1940). — PORTER, J. W.: Relationship between physical properties and structure of carotenes and colorless polyenes. Arch. of Biochem. a. Biophysics **45**, 291 (1953). — RABINOWITCH, E. M.: Photosynthesis and related processes. Bd. I, Bd. II, Teil 1. New York 1945, 1951. — ROUX, E., et CH. HUSSON: Pigments des chloroplastes et photosynthèse. C. r. Acad. Sci. Paris **235**, 1154 (1952). — RUDOLPH, H.: Über die Einwirkung des farbigen Lichtes auf die Entstehung des Chloroplasten-Farbstoffes. Planta (Berl.) **21**, 104 (1934). — RUGE, U.: Anzucht von Pflanzen bei ausschließlich künstlicher Beleuchtung. Z. Bot. **42**, 31 (1954). — RUNGE, F. G.: Zur Farbenchemie, Bd. III, S. 15. Berlin 1850. — SACHSSE, R.: Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe. Leipzig 1877. — SEYBOLD, A.: Zur Kenntnis der herbstlichen Laubblattfärbung. Bot. Archiv **44**, 551 (1943). — SEYBOLD, A., u. K. EGLE: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. I. Planta (Berl.) **26**, 491 (1937). — Lichtfeld und Blattfarbstoffe. II. Planta (Berl.) **28**, 87 (1938). — Zur chromatographischen Trennungsmethode der Blattfarbstoffe. Planta (Berl.) **29**, 114 (1939). — SEYBOLD, A., u. A. WEISSWEILER: Weitere spektrophotometrische Messungen an Laubblättern und an Chlorophyll-Lösungen. Bot. Archiv **44**, 102 (1942b). — SIMONIS, W.: Der Einfluß verschiedenfarbigen Anzuchtlichtes auf die CO_2-Assimilation und den Farbstoffgehalt von Helodea canadensis. Planta (Berl.) **29**, 192 (1939). — SIRONVAL, C.: Mesure de l'activité de la chlorophyllase par chromatographie sur papier. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 523 (1954). — A propos de la chromatographie sur papier de la chlorophylle et des caroténoides des feuilles. Arch. internat. Physiol. **41**, 563 (1954). — SMAKULA, A.: Über physikalische Methoden im chemischen Laboratorium. XII. Angew. Chem. **47**, 657 (1934). — SPOHN, H.: Eine einfache Methode zur Trennung der Blattfarbstoffe. Planta (Berl.) **23**, 657 (1935). — STRAIN, H. H.: Leaf Xanthophylls. Carnegie Inst. Publ. **1938**, No 490. — Chromatographic Adsorption Analyses. New York 1945. — Absorption spectra and isomerization of the chlorophylls. Science (Lancaster, Pa.) **116**, 174 (1952). — Paper chromatography of chloroplast pigments: Sorption at a liquid-liquid interface. J. Physic. Chem. **57**, 638 (1953). — Leaf xanthophylls: The action of acids on violaxanthin,

violeoxanthin, taraxanthin und tareoxanthin. Arch. of Biochem. a. Biophysics **48**, 458 (1954). — STRAIN, H. H., and W. M. MANNING: Chlorofucine, a green pigment of diatoms and brown algae. J. of Biol. Chem. **144**, 625 (1942). — STRAIN, H. H., W. M. MANNING and G. HARDIN: Xanthophylls and carotenes of diatoms, brown algae, dinoflagellates and sea-anemones. Biol. Bull. **86**, 169 (1944). — STROTT, A.: Der Einfluß der Umweltbedingungen auf die Ausbildung der Chloroplastenfarbstoffe. Jb. wiss. Bot. **86**, 1 (1938). — WENDEL, K.: Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes bei Pflanzen ebenen Standortes. Z. Naturwiss. **6**, 327 (1940). — Beiträge zur chromatographischen Analyse von Chlorophyll-Lösungen und deren kolorimetrischen und photometrischen Messungen. Planta (Berl.) **37**, 604 (1950). — ZAHN, R.: Lichtökologische Untersuchungen der Chloroplasten-Farbstoffe photostabiler und photolabiler Pflanzen. Diss. Frankfurt 1952. — ZECHMEISTER, L., u. L. v. CHOLNOKY: Die chromatographische Adsorptionsmethode, 2. Aufl. Wien 1938. — ZECHMEISTER, L., and G. KARMAKAR: The occurrence of phytofluene in green plant organs. Arch. of Biochem. a. Biophysica **47**, 161 (1953). — ZSCHEILE, F. P., J. W. WHITE, B. W. BEADLE and J. R. ROACH: The preparation and absorption spectra of five pure carotinoid pigments. Plant Physiol. **17**, 331 (1942).

Dr. ACHIM HAGER, Botanisches Institut der Universität München 19, Menzinger Str. 67

Planta, Bd. 48, S. 622—626 (1957)

Aus dem Institut für physiologische Botanik der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig

EIN SCHNELLVERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER PEROXYDASE-AKTIVITÄT IN PFLANZENPRESS-SÄFTEN

Von

R. KAUL

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. September 1956)

Als Standardmethode zur Bestimmung der Peroxydaseaktivität gilt noch heute das Purpurogallinverfahren von R. WILLSTÄTTER und A. STOLL. Für Pflanzenmacerate bzw. Rohextrakte aus Pflanzen muß dieses Verfahren recht umständlich gehandhabt werden, da Polyphenolase und Peroxydase interferieren und Fehler durch Autoxydation von Pyrogallol gesondert bestimmt werden müssen. J. A. LOCKHART und W. A. JENSEN haben diese Methode abgeändert, ohne auf die eine oder andere der oben genannten Fehlerquellen einzugehen.

L. O. RANDALL untersuchte die hemmende Wirkung verschiedener Thio-Verbindungen auf Peroxydase. Zur quantitativen Bestimmung der Fermentaktivität diente dabei die Oxydation von p-Aminobenzoesäure zu einem roten Farbstoff, welcher kolorimetriert wurde.

F. G. HASKINS baute ein direktes spektrophotometrisches Verfahren auf der alten Methode von H. UCKO und H. W. BANSI auf. Hierbei wird die Oxydation von Guajacol zum rotgefärbten Tetraguajachinon durch Peroxydase als Maß für die vorhandene Aktivität gewertet. Unerwünschte Nebenerscheinungen, wie Trübungen durch Autoxydationsprodukte von Guajacol und Trübungen durch den Fermentzusatz, bedingen auch hier kleinere Fehler.

Man ging neuerdings dazu über, einen für Peroxydasen sehr spezifischen Reaktionschemismus zu benutzen: die Oxydation von Benzidin zu Benzidinblau. Da das entstehende Benzidinblau in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlöslich bzw. instabil ist, lagerten Y. AVI-DOR und Mitarb. den Farbstoff an ein Ionenaustauschharz an und bestimmten die Farbtiefe visuell; exakte Messungen waren nicht möglich.

Den Angaben der letztgenannten Autoren zufolge ist auch ein Gemisch von Benzidin und Guajacol zu einem Farbstoff oxydierbar, der durch dreimalige Extraktion quantitativ in Butanol übergeführt werden kann. Auf dieser Erkenntnis wurde das unten beschriebene Verfahren aufgebaut. — Die Farbstoffbildung verlief schneller und einwandfrei reproduzierbar, wenn Mangan-(II)- und Pyrophosphationen gegenwärtig waren. Das stabile Manganpyrophosphat wirkte anscheinend als Redoxkatalysator. Eine ähnliche Wirkung durch Eisenpyrophosphat hervorzurufen gelang nicht. — Weiterhin zeigte es sich,

daß der weinrote, kolloidale Farbstoff bereits durch einmaliges Ausschütteln in Chloroform bzw. Chloroform-Alkohol (9:1) aufgenommen werden kann und darin stabil bleibt. Das Extinktionsmaximum liegt konstant bei 510 mμ.

Als p_H-Optimum für Peroxydase aus Weizenkeimpflanzen ergab sich p_H 4,6. Nur unbedeutende Unterschiede der Aktivität konnten zwischen p_H 4,5 und 5,5 gemessen werden. Außerhalb dieses Bereiches nahm die Aktivität schnell ab, um bei p_H 4,0 und 6,0 vollständig zu verschwinden. — Zur Pufferung des Reaktionsgemisches wurde keine besondere Pufferlösung benötigt, da die Pyrophosphationen für eine hinreichende p_H-Stabilität sorgten.

Einflüsse der Temperatur auf die Peroxydaseaktivität wurden nicht besonders untersucht, da bei Anwendung der Methode immer nur Vergleichsmessungen bei ausgeglichener Zimmertemperatur durchgeführt wurden. — Wie die Ergebnisse speziell angesetzter Versuche bei diffusem Raumlicht und bei völliger Dunkelheit aufzeigten, hat das Licht keinen Einfluß auf die Peroxydaseaktivität.

Materialien und Methoden

A. Lösungen. 1. Die Fermentlösung wurde durch Einbringen von 0,1 ml Pflanzenpreßsaft in 100 ml Wasser (über Glas destilliert) hergestellt. Eine gut entfettete Mikropipette wurde dazu verwendet. Durch mehrmaliges Ansaugen und Ausblasen gelang es, sämtlichen Preßsaft aus der Pipette in den mit Wasser gefüllten 100 ml Kolben einzuspülen.

2. Zur Herstellung der Pyrophosphatlösung wurden 4,46 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10\,H_2O$ in 40 ml Wasser gelöst und zur Neutralisierung 7,0 ml 1 n Salzsäure dazugegeben (p_H 7,5). Diese Lösung war bei dunkler und kühler Aufbewahrung maximal 1 Woche haltbar.

3. 0,005 m $MnSO_4$-Lösung.

4. 50 mg Benzidin und 135 mg Guajacol wurden in ein Gefäß eingewogen; dazu wurden 25 ml 10%ige Essigsäure pipettiert und bei 30—40° C gelöst. Im Eisschrank aufbewahrt, hält sich die Lösung ca. 4 Wochen. Eine mit der Zeit entstehende braune Trübung läßt sich abschleudern, ohne daß die Lösung dadurch entwertet wird.

5. Die Wasserstoffperoxydlösung wurde aus 30%igem Perhydrol (Merck) bereitet. — 0,1 ml wurden mit Wasser auf 25 ml verdünnt.

6. Chloroform (DAB 6).

B. Ansätze. 15 ml Schleudergläser wurden nacheinander mit 2 ml Fermentlösung (Lösung 1), 0,25 ml Pyrophosphatlösung (Lösung 2) und 0,1 ml Mangansulfatlösung (Lösung 3) beschickt. Der Zusatz von Mangansulfat erwies sich in den meisten Fällen als überflüssig, da die Fermentlösung ausreichend Manganionen enthielt. Zur Sicherheit wurde jedoch nie davon abgesehen.

Die Einpipettierungen von Benzidin-Guajacol, Wasserstoffperoxyd und Chloroform vollzogen sich nach einem strengen zeitlichen Schema. Jeweils 2 Tropfen Benzidin-Guajacol (Lösung 4), 0,05 ml verd. Wasserstoffperoxydlösung (Lösung 5) und 5 ml Chloroform (Lösung 6) wurden in die Schleudergläser gegeben. Die folgende Darstellung zeigt das

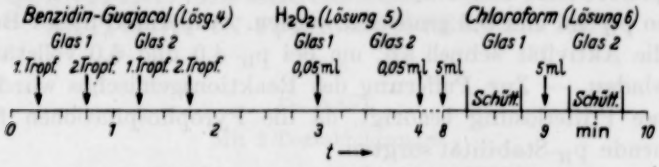


Abb. 1. Ansatzschema zum quantitativen Peroxydasetest

Verfahren für 2 Proben und 5 min Testzeit (bei Weizenpreßsaft waren 5 Minuten die geeignetste Testzeit).

Das Zutropfen des Benzidin-Guajacolgemisches erfolgte unter vorsichtigem Schütteln der Gläser, um unerwünschte Ausfällungen zu vermeiden. Wasserstoffperoxyd wurde aus einer Mikropipette zugegeben, bei welcher 0,05 ml gerade einem Tropfen entsprachen. — Das der Extraktion des entstandenen Farbstoffes dienende Chloroform wurde aus einer 5 ml-Pipette zu der im Schema angegebenen Zeit schlagartig zulaufen gelassen und die Pipette nach 10 Sekunden abgestreift. Hiernach wurden die Gläser mit dem Daumen verschlossen und 30 Sekunden intensiv geschüttelt. — Eine scharfe Trennung beider Flüssigkeitsschichten erhält man durch kurzes Schleudern bei 1000—1500 g. Anschließend saugt man die überstehende wäßrige Schicht mittels Wasserstrahlpumpe und Glascapillare ab und füllt das weinrot gefärbte Chloroform in trockene, saubere Schleudergläser. Nun schleudert man 5 Minuten bei 3300 g, wobei etwa noch vorhandene Trübungen beseitigt werden. Die Lösungen werden abschließend bei 510 mμ colorimetriert. — Parallelbestimmungen erübrigen sich nach kurzer Einarbeitung.

Tabelle 1. *Pseudoperoxydaseaktivität in Weizenpreßsaft* (Ansätze s. oben)

Ansätze	Sauerstoffübertragung in mm^3 durch 1 ml Preßsaft (bzw. Wasser); 5 min Testzeit	
	Versuch I	Versuch II
Ohne Preßsaft	40	50
Mit Preßsaft	2150	2080
Preßsaft auf 80° C f. 2 min	520	500
f. 5 min	550	520

Eine Blindbestimmung ohne Fermentlösung soll bei jeder Serie mit angesetzt werden. Die Farbstoffbildung ohne Peroxydasewirkung war jedoch dermaßen gering, daß die Vergleichsmessungen ohne Bedenken auch gegen reines Chloroform durchgeführt werden konnten (s. a. Tabelle 1).

Der Mitwirkung der Pseudoperoxydasen bei der Bestimmung der Peroxydaseaktivität wird bei den eingangs zitierten Methoden nicht immer die notwendige Beachtung geschenkt. Auf Grund der Hitzelabilität der reinen Peroxydase ist eine Unterscheidung leicht möglich. Tabelle 1 zeigt, wieviel Sauerstoff noch übertragen wird, wenn der Preßsaft für 2 Minuten bzw. 5 Minuten auf 80° C erhitzt wird.

Daß es sich hierbei um eine pseudofermentative Restaktivität handelt, beweist die Tatsache, daß durch 2 Minuten bzw. 5 Minuten lang erhitzten Preßsaft dieselben Werte erhalten wurden.

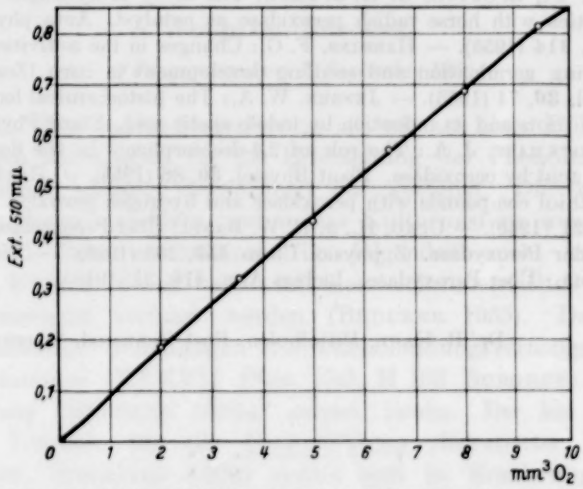


Abb. 2. Eichkurve für die Sauerstoffübertragung auf Benzidin-Guajacol durch pflanzliche Peroxydase (Schichtdicke bei den Ext.-Mess. 10 mm)

C. Aufnahme der Eichkurve. Über die Struktur des aus Benzidin und Guajacol gebildeten Farbstoffes herrscht Unklarheit, so daß keine stöchiometrischen Beziehungen zwischen der Farbtiefe und der Peroxydaseaktivität (in mm^3 O_2) ermittelt werden konnten. Die Eichkurve mußte aus diesem Grunde empirisch aufgenommen werden. Da der Sauerstoff bei der Reaktion nicht in Erscheinung tritt, boten sich auch hier Schwierigkeiten. Zugrunde gelegt wurde schließlich die Annahme, daß sich kein Gleichgewicht zwischen Substrat (H_2O_2) und Reaktionsprodukt (Farbstoff) einstellt, sondern die Reaktion einseitig zum Farbstoff verläuft; diese Annahme schien gerechtfertigt, da der Farbstoff unlöslich ist und sich nach einer gewissen Zeit vollständig absetzt. — Bekannte Mengen Wasserstoffperoxyd wurden gespalten und die Farbtiefe nach Ende der Reaktion (1 Stunde) bestimmt. Abb. 2 zeigt die hierbei erhaltene Eichkurve, welche auch bei Verwendung verschiedener pflanzlicher Peroxydasepräparate reproduziert werden konnte.

Für die Umrechnung auf mm^3 O_2 wurde folgende Beziehung zugrunde gelegt:

$$1 \text{ Vol. } 30\%\text{iges } H_2O_2 \mathrel{\widehat{=}} 100 \text{ Vol. } O_2.$$

Die einzelnen Kurvenpunkte stellen Mittelwerte aus 4 Wiederholungsmessungen dar; die maximale Abweichung betrug $\pm 2\%$.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, wofür an dieser Stelle vielmals gedankt sei.

Literatur

Avi-Dor, Y., E. Cutolo u. K. G. Paul: The assay of hydrogen peroxide in small quantities with horse radish peroxidase as catalyst. Acta physiol. scand. (Stockh.) **32**, 314 (1955). — Haskins, F. G.: Changes in the activities of several enzymes during germination and seedling development in corn (Zea Mays L.). Plant Physiol. **30**, 74 (1955). — Jensen, W. A.: The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indole acetic acid. Plant Physiol. **30**, 426 (1955). — Lockhart, J. A.: The role of 2,4-dichlorphenol in the destruction of indole acetic acid by peroxidase. Plant Physiol. **30**, 86 (1955). — Randall, L. O.: Reaction of thiol compounds with peroxidase and hydrogen peroxide. J. of Biol. Chem. **164**, 521 (1946). — Ucko, H., u. H. W. Bansi: Über Peroxydase. III. Mitt. Zur Kinetik der Peroxydase. Z. physiol. Chem. **159**, 235 (1926). — Willstätter, R., u. A. Stoll: Über Peroxydase. Liebigs Ann. **416**, 21 (1918).

Dr. R. Kaul, Mittelhofen, Post Rennerod, Oberwesterwald

Planta, Bd. 48, S. 627—630 (1957)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

Kurze Mitteilung

ZUR BIOGENESE DER GALLUS- UND PROTOCATECHUSÄURE DURCH PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS

Von

WOLFGANG BRUCKER

(Eingegangen am 1. September 1956)

Der Pilz *Phycomyces blakesleeanus* ist, wie aus einer Reihe früherer Mitteilungen hervorgeht, für die Erforschung der Phenolcarbonsäurebildung durch niedere Organismen gut geeignet. Die von ihm in reichlicher Menge gebildete und in das Kulturmedium ausgeschiedene Gallus- und Protocatechusäure (im folgenden auch kurz Phenol genannt) können durch ein einfaches colorimetrisches Verfahren bequem messend verfolgt werden (BRUCKER 1955). Dabei hatten sich gegenläufige Beziehungen des Phenolbildungsvermögens unseres Versuchsstammes (XXXVII *Phyc. blak.* H 102 BURGEFF) zur Carotinoidbildung (BRUCKER 1956a) zeigen lassen. Der bis in neueste Zeit als Vorstufe für die Phenolbildung diskutierte meso-Inosit (KURSANOW, SCHRÖTER 1956) erwies sich in Ernährungsversuchen als einflußlos auf die Produktion von Phenolcarbonsäuren (BRUCKER 1956b)[1]. In Übereinstimmung mit GREENBERG (1954) scheinen auch die Säuren des Citronensäurecyclus und die direkte Cyclisierung von Glucose als unmittelbare Vorläufer aromatischer Körper auszuscheiden. Die eventuelle Rolle des Seduheptulosephosphates (STEVENS und NORD 1955, SPRECHER 1956) als Vorstufe der Shikimi- und Prephensäure (DAVIS und Mitarbeiter 1953/54) soll zu späterer Zeit mit markiertem Substrat unter unseren Gesichtspunkten studiert werden. Es blieb daher vorerst die Aufgabe, unter anderem den Einfluß der Eiweißabbauprodukte und anderer N-haltiger Substanzen auf die Phenolproduktion des Pilzes zu untersuchen.

Die Grundnährlösung setzt sich in Anlehnung an SCHOPFER (1939) wie folgt zusammen: 30 g Glucose, 2 g Glycin, 0,5 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 1,5 g KH_2PO_4, 40 μ g Aneurin, 1000 ml H_2O dest. Kultiviert wurde bei $23^0 \pm 0{,}5$ in 200 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Nährlösung.

[1] Inzwischen durchgeführte Versuche mit ^{14}C-markiertem m-Inosit erhärten die Ergebnisse. WEYGAND, BRUCKER, GRISEBACH und SCHULZE, Z. Naturforschg. **1957** (im Druck).

Steigert man im Nährmedium unter sonst gleichen Bedingungen die Konzentration von Glycin (Tabelle 1) von 1,0 g/l bis 4,0 g/l, so findet man nach 12tägigem Wachstum der Pilze eine Vergrößerung des Erntegewichtes um etwa das Doppelte. Die Phenolproduktion, umgerechnet auf gleiche Gewichtsteile der Pilze, steigt ebenfalls an.

Tabelle 1 (Erklärung siehe Text)

Glycin g/l	Trockengewicht (TG) in mg nach 12 Tagen	Phenolbildung	
		mg gesamt	mg/100 mg TG
1,0	101	4,3	4,3
1,5	129	6,0	4,7
2,0	145	7,3	5,0
2,5	148	7,0	4,7
3,0	156	7,8	5,0
3,5	163	9,1	5,6
4,0	202	11,4	5,6

Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte aus 10 Kulturen.

Auf einer 2,0 g Asparagin-N-äquivalenten Menge von Ammoniumnitrat kultiviert, erreicht der Pilz etwa $^2/_3$ des Gewichtes, verringert aber seine Phenolproduktion (bezogen auf 100 mg TG) auf den fünften Teil.

Eine erhebliche Beeinflussung der Phenolbildung zeigte sich auch beim Vergleich einzelner Aminosäuren und anderer N-haltiger organischer Verbindungen im Nährmedium (Tabelle 2).

Tabelle 2 (Erklärung siehe Text)

Substrat 2 g/l	Trockengewicht (TG) in mg nach 12 Tagen	Phenolbildung	
		mg gesamt	mg/100 mg TG
Glycin	99	3,5	3,5
d-Alanin	100	4,2	4,2
d,l-Leucin	113	3,1	2,7
d-Isoleucin	107	2,7	2,5
d,l-Valin	94	4,5	4,8
d,l-Methionin . . .	78	2,2	2,8
l-Cystin[1]	95	1,5	1,6
d,l-Asparaginsäure	77	3,2	4,1
d,l-Asparagin . . .	119	4,1	3,5
d,l-Glutaminsäure	100	2,9	2,9
d,l-Phenylalanin .	20	0,5	2,6
l- und d,l-Tyrosin[1]	84	6,3	7,5
l-Tryptophan . . .	96	4,6	4,8
Harnstoff	101	3,2	3,2
Diphenylurethan .	73	3,2	4,4
Hypoxanthin[1] . .	106	2,4	2,3

[1] Gesättigte Lösung über Bodensatz.

Auch die Zugabe von Aminobenzoesäure ließ den Pilz in einer anderen Versuchsreihe die Phenolmenge (3,1 mg/100 mg TG) von etwa auf Glycin kultivierten Organismen kaum erreichen. Der p_H-Wert lag für alle Versuche zu Beginn annähernd bei 5,0. Die Schwankung der Trockengewichte nach 12tägiger Kultur wird zu einem kleinen Teil durch die stöchiometrischen Verhältnisse der Substrate, vor allem des darin enthaltenen Stickstoffes bedingt sein. Eine Zugabe von molaren Mengen der einzelnen Substrate führte nicht zu übersichtlicheren Ergebnissen. Die Unverträglichkeit des Phenylalanins zeigt sich schon in den Versuchen von BERNHARD und ALBRECHT (1947), findet bisher aber keine Kausalerklärung.

Versuche von Krebs (aus EULER 1934, Chemie der Enzyme 2. Teil, 3. Abschn., S. 599) über die Geschwindigkeit der Desaminierung von Aminosäuren durch Rattennierenschnitte geben vielleicht einen Hinweis. Der Quotient aus dem

gebildeten Ammoniak: Trockengewicht × Stunden ist z. B. für Glycin und Tyrosin 4,34. Für l-Phenylalanin liegt er bei 10,4 und für das Phenylalanin der d-Reihe sogar bei 77,0. Wenn man diese Verhältnisse mit allem Vorbehalt auf den *Phycomyces* überträgt, so könnte vielleicht der aus dem Substrat in verhältnismäßig großen Mengen abgespaltene Ammoniak nicht im entsprechenden Maße entgiftet werden und so zu der beobachteten Wachstumshemmung führen. Eine p_H-Erhöhung des Kulturmediums nach dem Pilzwachstum ist aus den Daten BERNHARD und ALBRECHTS (1947) bei Verwendung von Phenylalanin als N-Quelle gegenüber anderen Aminosäuren zu entnehmen.

Die bei weitem höchste Phenolproduktion erfolgt bei Zugabe von Tyrosin als N-Quelle. Aber auch Tryptophan, Valin, Diphenylurethan und Alanin erweisen sich als günstige Substrate. Dann folgen Asparaginsäure, Asparagin, Glycin, Harnstoff und alle übrigen der ausgetesteten Stoffe. Die das Wachstum des Pilzes beeinflussenden Faktoren spielen offensichtlich für die Phenolbildung nur eine untergeordnete Rolle. Die Verdoppelung der Phenolproduktion durch Tyrosingaben gegenüber Glycin und Asparagin oder gar die Verdreifachung gegenüber Isoleucin kann nur durch eine bessere Verwertbarkeit erklärt werden.

Tabelle 3 (Erklärung siehe Text)

Substrat g/l	Trockengewicht (TG) in mg	Phenolbildung	
		mg gesamt	mg/100 mg TG
20 NH_4-Lactat	31	0,6	2,0
20 NH_4-Lactat 2 Glycin	20	0,4	2,0
20 NH_4-Lactat 2 Tyrosin	30	3,7	12,3

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß von Glycin und Tyrosin auf die Phenolbildung bei Verwendung von Lactat als C-Quelle geprüft. NH_4-Lactat allein hatte (BRUCKER 1956a) nur zu geringen Mengen an Phenolcarbonsäuren geführt (Tabelle 3).

Die Zugabe von Glycin verringerte das Pilzgewicht aus vorerst ungeklärten Gründen. Die Phenolbildung ist unbeeinflußt. Eine Tyrosinzugabe läßt dagegen die Produktion an Phenolcarbonsäuren um das Sechsfache ansteigen.

Die Rolle des Tyrosins als Substrat für die Bildung von Oxybenzol durch die bakterielle Darmfäulnis, oder die Entstehung von „Dopa", Hydrocumar- und Kaffeesäure und die oxydative Desaminierung und Decarboxylierung etwa zur Homogentisinsäure (s. EDLBACHER-LEUTHARDT 1955), sind seit langem bekannt.

Durch β-Oxydation (KNOOP 1904) werden im Tierkörper phenylsubstituierte Säuren mit 3 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette zu Benzoesäure abgebaut. Tyrosin könnte bei *Phycomyces* nach der Desaminierung dem gleichen Abbau unterliegen. Zu irgendeinem Zeitpunkt hätte die Oxydation zur 3,4,5-Trioxybenzoesäure zu erfolgen.

Es ist daher neben der Beteiligung von Zuckerderivaten für die Bildung von Phenolen durch *Phycomyces* eine wesentliche Rolle des

Eiweißstoffwechsels, besonders von desaminierten Aminosäuren, anzunehmen. Unter ihnen spielt Tyrosin eine bevorzugte Rolle. Eine weitere Mitteilung über hemmungsanalytische Studien der beteiligten Fermentsysteme soll unsere Auffassung stützen.

Literatur

Bernhard, B., u. H. Albrecht: Helvet. chem. Acta **30**, 627 (1947). — Brukker, W.: Arch. Protistkde **100**, 339 (1955). — Naturwiss. **43**, 450 (1956). — Flora (Jena) **144**, 154 (1956). — Davis, B. D.: Science (Lancaster, Pa.) **118**, 251 (1953). — Davis, B. D., u. E. S. Mingioli: J. Bacter. **66**, 129 (1953). — Greenberg, D.: Chemical pathways of metabolism, Bd. II, S. 113f. New York 1954. — Edlbacher, S., u. F. Leuthardt: Lehrbuch der physiologischen Chemie, S. 393f. Berlin 1955. — Knoop, F.: Beitr. chem. Physiol. u. Path. **6**, 150 (1904). — Kursanow, A. L.: Kulturpflanze, Beih. 1 **1956**, 29. — Schopfer, W. H.: Erg. Biol. **10**, 1 (1939). — Schröter, H. B.: Kulturpflanze, Beih. 1 **1956**, 49. — Sprecher, E.: Planta (Berl.) **47**, 323 (1956). — Stevens, G. de, u. F. F. Nord: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 3, S. 392f. Berlin 1955. — Weiss, U., C. Gilvarg, E. S. Mingioli and B. D. Davis: Science (Lancaster, Pa.) **119**, 774 (1954).

Dr. Wolfgang Brucker, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Temperatur und Leben

Von Professor Dr. **Herbert Precht,** Zoologisches Institut der Universität Kiel, Dr. **Jes Christophersen,** Bakt. Institut der Bundes-Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Kiel, und Professor Dr. **Herbert Hensel,** Physiologisches Institut der Universität Marburg a. d. Lahn. 3 Teile in einem Band. Mit 182 Abbildungen XII, 514 Seiten Gr.-8°. 1955.

Ganzleinen DM 78.—

Aus Besprechungen: ... Auf einem allgemein recht hohen Niveau geschrieben, enthält das Buch eine ungeheuere Zahl von Literaturangaben und Literaturauszügen, und zahlreichen Tabellen und Abbildungen mit Zahlenangaben über Versuchsergebnisse, so daß es eine außerordentlich reichhaltige Sammlung des gesamten Wissensstoffes über Temperatur und Leben darstellt. Überall ist der Anschluß an die physikalischen und physikalisch-chemischen Gesetze gesucht. ... Im Gegensatz zu vielen anderen Büchern ist kein geschlossenes Literaturverzeichnis gebracht worden, sondern die Literatur wird in Fußnoten jeweils an der Stelle zitiert, an der sie benötigt wird. Das Aufsuchen erleichtert allerdings ein Autorenregister mit Seitenangaben. Das umfangreiche Sachverzeichnis entspricht allen Wünschen. Die Ausstattung des Buches ist vorzüglich.

Professor Ranke, Erlangen in „Klinische Wochenschrift"

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Handbuch der Pflanzenphysiologie
Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von **W. Ruhland,** Unterdeufstetten, in Gemeinschaft mit E. Ashby, Belfast · J. Bonner, Pasadena · M. Geiger-Huber, Basel · W. O. James, Oxford · A. Lang, Los Angeles · D. Müller, Kopenhagen · M. G. Stålfelt, Stockholm. In 18 Bänden. Jeder Band ist einzeln käuflich.

Im März 1957 wird erscheinen:

7. Band:

Stoffwechselphysiologie der Fette und fettähnlicher Stoffe

Redigiert von M. Steiner, Bonn am Rhein. Mit 59 Abbildungen. Etwa 450 Seiten Gr.-8°. 1957

Vorbestellpreis gültig bis zum Erscheinen Ganzleinen DM 86.40
Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen Ganzleinen DM 108.—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches gilt der Vorbestellpreis auch nach Erscheinen des Bandes weiter als Subskriptionspreis, jedoch ist jeder Band zum Ladenpreis einzeln käuflich.

Inhaltsübersicht: I. **Einführung und Übersicht.** Von M. Steiner, Bonn a. Rhein. — II. **Die Pflanzenfette** (Chemie und sonstige Eigenschaften, Methoden, Verbreitung in Pflanzenarten und -organen). The fats of the higher plants. By M. L. Meara, Manchester, Great Britain. Die Fette der Algen. Von H. v. Witsch, Freising-Weihenstephan. Die Fette der Pilze. Von M. Steiner, Bonn a. Rhein. Les lipides bactériens. Par J. Asselineau, Paris, France. — III. **Fermente des Fettstoffwechsels.** Lipasen. Von E. Bamann und E. Ullmann, München. Auf Fettsäuren eingestellte Oxydasen, Dehydrasen und Reduktasen. Die α- und die β-Oxydation. Von W. Franke, Köln und H. Frehse, Münster i. W. — IV. **Biochemistry of fat formation.** By P. K. Stumpf, Berkeley, Calif., U.S.A. — V. **Physiologie der Fettbildung und Fettspeicherung.** Die Physiologie der Fettbildung und Fettspeicherung bei niederen Pflanzen. Von M. Steiner, Bonn a. Rhein. Physiologie der Fettbildung und Fettspeicherung bei höheren Pflanzen. Von A. Zeller, Cambridge, Great Britain. — VI. **Die Mobilisierung der Fette bei der Keimung.** Von A. Zeller, Cambridge, Great Britain. — VII. **Die wirtschaftliche Bedeutung der Pflanzenfette und Fettpflanzen.** Von K. Schmalfuss, Halle-Wittenberg. — VIII. **The phosphatides and glycolipids.** By J. A. Lovern, Aberdeen, Scotland. — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis. — Namenverzeichnis — Author Index. — Sachverzeichnis (Deutsch- Englisch). — Subject Index (English-German).

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany